FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

Année 1967 N°

582

T H E S E

pour le

D O C T O R A T E N M E D E C I N E

(Diplôme d'Etat)

PAR

M I L G R O M Edwin

INTERNE DES HOPITAUX DE PARIS

Né le 6.12.1936 à LWOW (Pologne)

Présentée et soutenue publiquement le 19

LES 17β-HYDROXYSTEROIDE OXYDO-REDUCTASES

(Etude expérimentale des enzymes de Pseudomonas Testosteroni et de globules rouges humains)

Président : M. DESGREZ, Professeur

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

Année 1967 N°

T H E S E

pour le

D O C T O R A T E N M E D E C I N E

(Diplôme d'Etat)

PAR

M I L G R O M Edwin

INTERNE DES HOPITAUX DE PARIS

Né le 6.12.1936 à LWOW (Pologne)

Présentée et soutenue publiquement le 19

LES 17β-HYDROXYSTEROIDE OXYDO-REDUCTASES

(Etude expérimentale des enzymes de Pseudomonas Testosteroni et de globules rouges humains)

Président : M. DESGREZ, Professeur

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

15/1/1967

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. Alajanouanine (T.), Bénard (H.), Bernard (E.), Binet (L.), Bulliard (H.) Cathala (J.), Chabrol (E.), Chailley-Bert (P.), Cheymol (J.), Debré (R.), Fey (B.), Galliard (H.), Gaudart-d'Allaines (F. de), Gennes (L. de), Giroud (A.), Hazard (R.), Heuyer (G.), Laroche (G.), Lavier (G.), Lelong (M.), Lévy (Mlle J.), Lévy-Solal (E.), Lian (C.), Marchal (G.), Mathieu (P.), Monod (R.), Moreau (R.), Moulonguet (P.), Pasteur Vallery-Radot, Petit-Dutaillis (D.), Piédelièvre (R.), Quému (J.), Renard (G.), Senèque (J.), Strohl (A.), Tanon (L.), Verne (J.).

DOYEN..... Georges BROUET
1er ASSESSEUR... Daniel BARGETON
2e ASSESSEUR... Jean GOSSET

1. - PROFESSEURS

1° CHAIRES DE SCIENCES FONDAMENTALES

a) Professeurs titulaires :

	MM.
Anatomie	DELMAS (A.)
-	HUARD (P.)
Anatomie et cytologie pathologiques	DELARUE (J.)
Anesthésiologie	VOURC'H (G.)
Bactériologie et virologie	TOURNIER (P.)
Biochimie médicale	JAYLE (M.-F.)
-	POLONOVSKI (J.)
-	DESGREZ (P.)
Biologie appliquée à l'Education physique et aux Sports....	MALMEJAC (J.)
Biologie médicale	FAUVERT (R.)
Biophysique médicale	BUGNARD (L.)
-	DOGNON (A.)
-	DJOURNO (A.)
Cancérologie expérimentale	MATHE (G.)

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546604_0081

MM.

Chimie pathologique	SCHAPIRA (G.)
Génétique fondamentale	LEJEUNE (J.)
Histoire de la médecine et de la chirurgie	COURY (Ch.)
Histologie et Embryologie	TUCHMANN-DUPLESSIS (H.)
- -	COUJARD (R.)
Hygiène et médecine préventive	BOYER (J.)
Médecine du Travail	DESOILLE (H.)
Médecine légale, Droit médical et déontologie	DEROBERT (L.)
Microbiologie (Bactériologie et virologie)	FASQUELLE (R.)
Parasitologie	N...
Pathologie chirurgicale	LAURENCE (G.)
-	KUSS (R.)
-	VERNE (J.-M.)
Pathologie exotique	BRUMPT (L.-C.)
Pathologie expérimentale et comparée	MERKIEN (F.-P.)
Pathologie médicale	LAROCHE (Cl.)
-	BRICAIRE (H.)
-	PEQUIGNOT (H.)
Pathologie respiratoire	TURIAF (J.)
Pathologie et thérapeutique générales	MAURICE (P.)
Pharmacologie	BOISSIER (J.-R.)
-	LECHAT (P.)
Physiologie	BARGETON (D.)
-	PARROT (J.)
Physiologie et pathologie obstétricales	LEPAGE (F.)
Radiologie médicale	DESGREZ (H.)
Technique chirurgicale et Chirurgie expérimentale	N...
Thérapeutique	LAMOTTE (M.)
Thérapeutique appliquée	N...

b) Professeurs à titre personnel :

Anatomie	CABROL (Ch.)
Anatomie anthropologique	OLIVIER (G.)

	MM.
Anatomie pathologique	NEZELOF (Ch.)
Bactériologie	BARBIER (P.)
Biochimie médicale	DREYFUS (J.-Cl.)
Biologie médicale	BOURLIERE (F.)
Parasitologie	LARIVIERE (M.)
Pathologie expérimentale	LOEPER (J.)
Physiologie	DEJOURS (P.)
	SCHERRER (J.)
Physique médicale	KELLERSHOHN (L.)
	GOUGEROT (L.)
	ROUCAYROL (J.-Cl.)
	TUBIANA (M.)
Radiologie médicale	FISCHGOLD (H.)

2° CHAIRES DE SCIENCES CLINIQUES

a) Professeurs titulaires :

	MM.
Clinique carcinologique	DENOIX (P.)
Clinique carcinologique chirurgicale (Necker)	REDON (H.)
Clinique cardiologique (Broussais)	SOULIE (P.)
- - (Boucicaut)	LENEGRE (J.)
Cliniques chirurgicales ... Beaujon	LORTAT-JACOB (J.-L.)
-	BAUMANN (J.)
Cochin	LEGER (L.)
Hôtel-Dieu	PATEL (J.)
Saint-Antoine	GOSSET (J.)
Salpêtrière	SICARD (A.)
Tenon	OLIVIER (Cl.)
Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique : Cochin	MERLE d'AUBIGNE (R.)
Foch	PADOVANI (P.)
Beaujon	CAUCHOIX (J.)

Clinique de chirurgie infantile et orthopédique (Enfants Malades) ..... FEVRE (M.)

Clinique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais) ... DUBOST (Ch.)

Clinique de chirurgie thoracique (Laennec) ..... MATHEY (J.)

Clinique dermatologique (Saint-Louis) ..... DUPERRAT (F.)

Clinique endocrinologique (Pitié) ..... DECOURT (J.)

Clinique de génétique médicale (Enfants Malades) ..... LAMY (M.)

Clinique chirurgicale et gynécologique (Broca) ..... HUGUIER (J.)

Clinique des maladies cutanées et syphilitiques (Saint-Louis) ..... DEGOS (R.)

Clinique des maladies des enfants (Enfants Malades) ... TURPIN (R.)

Clinique des maladies infectieuses (Claude Bernard) ... MOLLARET (P.)

Clinique des maladies mentales et de l'encéphale (Sainte-Anne) ..... DELAY (J.)

Clinique des maladies du sang (Broussais) ..... BERNARD (J.)

Clinique des maladies du système nerveux (Salpêtrière) . CASTAIGNE (P.)

Cliniques médicales ...
- (Bicêtre ..... DEPARIS (M.)
- Broussais ..... [illegible]
- Cochin ..... [illegible]
- Hôtel-Dieu ..... [illegible]
- Pitié ..... [illegible]
- Saint-Antoine ..... [illegible]
- (Saint-Antoine ..... KOURILSKY (R.)
- Saint-Antoine ..... [illegible]

Clinique d'hydrologie et de climatologie (Bichat) ..... DEBRAY (Ch.)

Clinique médicale infantile et pédiatrie sociale (Enfants Malades)..... MARIE (J.)

Clinique médicale propédeutique (Broussais) ..... JUSTIN-BESANÇON (L.)

Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies métaboliques (Hôtel-Dieu) ..... DEROT (M.)

Clinique néphrologique (Necker) ..... HAMBURGER (J.)

Clinique de neuro-chirurgie (Pitié) ..... DAVID [illegible]

M.

Clinique neurologique (Salpêtrière) ..... GARCIN (R.)

Cliniques obstétricales ... (Baudelocque ..... LACOMME (M.)
(Saint-Antoine ..... MERGER (R.)

Clinique obstétricale et gynécologique (Port-Royal) ... VARANGOT (J.)

Clinique ophtalmologique (Hôtel-Dieu) ..... OFFRET (G.)

- - (Cochin) ..... BREGEAT (P.)

Clinique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière) ..... AUBRY (M.)

Clinique de pédiatrie (Trousseau) ..... MOZZICONACCI (P.)

Clinique de pédiatrie et de puériculture
(Saint Vincent de Paul) ..... THIEFFRY (S.)

Clinique de pneumo-phtisiologie (Laennec) ..... BROUET (G.)

Clinique de neuro-psychiatrie infantile (Salpêtrière) . MICHAUX (L.)

Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin) . COSTE (F.)

Clinique de rhumatologie (Lariboisière) ..... SEZE (S. de)

Clinique stomatologique (Salpêtrière) ..... DECHAUME (M.)

Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard) ..... ROUX (M.)

Clinique thérapeutique médicale (Saint-Antoine) ..... LEMAIRE (A.)

Clinique toxicologique (F. Widal) ..... GAULTIER (M.)

Clinique traumatologique et orthopédique (R.-Poincaré). JUDET (R.)

Clinique urologique (Cochin) ..... ABOULKER (P.)

- - (Necker) ..... COUVELAIRE (R.)

Hygiène et clinique de la première enfance (Trousseau). LAPLANE (R.)

Séméiologie médicale (A. Chantin) ..... DOMART (A.)

- - (Lariboisière) ..... BOUVRAIN (Y.)

- - (Pitié) ..... RAMBERT (P.)

- - (Rothschild) ..... WOLFROMM (R.)

Séméiologie et clinique chirurgicales (Broussais) ..... POILLEUX (F.)

b) Professeurs à titre personnel :

Hématologie ..... ANDRE (R.)
BOUSSER (J.)

Hydrologie et climatologie ..... GIBERTON (A.)

Maladies infectieuses	BASTIN (R.)
Médecine	AZERAD (E.) BOUR (H.) CAROLI (J.) DREYFUS (B.) GROSSIORD (A.) [illegible] LAUNAY (Cl.) PAYET (M.) PERRAULT (M.) SIGUIER (F.) WORMS (R.)
Néphrologie	[illegible]
Neuro-chirurgie	LE [illegible]
Neurologie	LHERMITTE (F.)
Neuro-psychiatrie	PICHOT (P.)
Oto-Rhino-Laryngologie	MADURO (R.)
Pédiatrie	POLONOVSKI (Cl.) ROYER (P.)
Pneumo-Phtisiologie	KREIS (B.) MEYER (A.)
Rhumatologie	DELBARRE (F.)

II. - PROFESSEURS SANS CHAIRE

Anatomie pathologique	GOUYGOU (Ch.)
Bactériologie	CHRISTOL (D.)
Biochimie médicale	CARTIER (P.) GONNARD (P.) NORDMANN (J.)
Biologie médicale	HARTMANN (L.)

Chirurgie	CERCLUNET (G.)
Hématologie	[illegible] (G.)
Maladies infectieuses	DUPONT (J.)
Neuro-psychiatrie	TANTEU (C.)
Pédiatrie	ROSSIER (A.)
Physique médicale	COURSAGET (J.) GREMY (F.)
Physiologie	GIRARD (Fr.)
Stomatologie	JHAUT (Mme A.)

III. - PROFESSEURS DETACHES DANS LES UNIVERSITES ETRANGERES

Bactériologie	HAUDUROY (P.) Pr. s. ch.
Pathologie chirurgicale	RUDIER (J.) Pr. s. ch.

IV. - PROFESSEURS ASSOCIES

Hormonologie	MORICARD (R.)
Statistique médicale et épidémiologique	SCHWARTZ (D.)

Secrétaire général de la Faculté	M. IENA (J.)
Conseiller administratif	Mlle CHAINTREUIL (G.)
Conservateur en Chef de la Bibliothèque	M. le Docteur HAHN (A.)
Conservateur du Musée d'Histoire de la Médecine	
Conservateurs	Mlles DU[illegible] LAURENT (C.), [illegible]
Bibliothécaires	Mmes CONET (J.) [illegible] [illegible]OZOY ([illegible])

Par délibération en date du 9 décembre 17[illegible], l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A Monsieur le Professeur P. DESGREZ,

qui m'a fait l'honneur de présider cette thèse et qui

m'a accueilli dans son service au CHU Pitié Salpêtrière

En témoignage de toute ma respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Agrégé E.-E. BAULIEU

Ce travail a été fait dans son laboratoire.

Son aide constante, sa compréhension et son exemple ont confirmé ma vocation biochimique.

Qu'il trouve ici l'expression de mon admiration et de ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur GILBERT-DREYFUS

dont l'enseignement pendant mon externat et mon internat a été déterminant dans ma vocation endocrinologique.

Qu'il soit assuré de mon respectueux attachement.

A Monsieur le Professeur M. DEPOT

Dans son service j'ai connu un incomparable climat d'amitié et d'activité intellectuelle.

Qu'il trouve ici l'assurance de ma gratitude et de ma fidélité.

A Monsieur le Professeur H. BRICAIRE

Son sens clinique et sa clarté sont pour moi un exemple.

Qu'il soit assuré de ma gratitude pour son enseignement et son accueil si amical.

A Monsieur le Professeur A. JOST

dont l'enseignement m'a fait désirer me consacrer à la recherche endocrinologique.

En respectueux hommage.

A Monsieur le Professeur M.-F. JAYLE

qui m'a accueilli à la Faculté de Médecine.

En témoignage de ma gratitude et de mon respect.

A Monsieur le Docteur A. NETTER

qu'il veuille bien trouver ici l'expression de mon respectueux attachement.

A Monsieur le Professeur M. LAMOTTE

Mon premier maître d'internat.

Qu'il soit assuré de ma fidélité et de mon attachement.

A Monsieur le Professeur Y. BOUVRAIN

En respectueux hommage.

A Monsieur le Professeur Agrégé A. RUBENS-DUVAL

En témoignage de gratitude et de respect.

A mes Maîtres dans les Hôpitaux

Externat et externat en premier :

Monsieur le Docteur MIALARET

Monsieur le Professeur Agrégé BROCARD

Monsieur le Docteur HILLEMAND

Monsieur le Docteur ROUQUES

Monsieur le Docteur LEMOYNE

Externat et internat :

Monsieur le Professeur GILBERT-DREYFUS

Monsieur le Professeur BOUVRAIN

Internat :

Monsieur le Professeur LAMOTTE

Monsieur le Professeur Agrégé RUBENS-DUVAL

Monsieur le Docteur NETTER

Monsieur le Professeur DEROT

Monsieur le Professeur BRICAIRE

A mes autres Maîtres dans les Hôpitaux

Madame le Professeur Agrégé S. LAMOTTE-BARTLION

Monsieur le Professeur Agrégé J. VILLAUMEY

Madame le Docteur A. LAMBERT-NETTER

Monsieur le Docteur P. LUMBROSO

Monsieur le Professeur Agrégé G. TCHOBROUTSKY

Monsieur le Professeur Agrégé L. MOREAU

Monsieur le Docteur J. LEPRAT

Monsieur le Professeur Agrégé R. SIAMA

Madame le Professeur Agrégé G. DELZANT

Monsieur le Professeur Agrégé J. SEBAOUN

Monsieur le Professeur Agrégé . LEGRAND

A Monsieur le Docteur P. ROBEL

Mon guide dans la chimie des stéroides

En reconnaissance de sa patience inusable.

A Monsieur le Docteur R. EMILIOZZI

A mes camarades du laboratoire

A mes collègues de l'internat des Hôpitaux de Paris.

P L A N

I - INTRODUCTION

II - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A - 17β-hydroxystéroide deshydrogénase de Pseudomonas Testosteroni

B - 17β-hydroxystéroide deshydrogénase du placenta humain

C - Transhydrogénation et 17β-hydroxystéroide deshydrogénase placentaire

D - Localisation histochimique de la 17β-hydroxystéroide deshydrogénase du placenta.

E - La 17β-hydroxystéroide deshydrogénase d'érythrocytes humains

F - Les 17β-hydroxystéroide deshydrogénases du foie

G - Les 17β-hydroxystéroide deshydrogénases du rein

H - Les 17β-hydroxystéroide deshydrogénases du testicule

I - Les 17β-hydroxystéroide deshydrogénases des autres organes.

III - MATERIEL ET METHODES GENERALES

1. Liste des abréviations et des conventions
2. Matériel et produits utilisés
3. Méthodes générales

IV - EXPERIENCES FAITES SUR LA 17β-HYDROXYSTEROIDE OXYDO-REDUCTASE DE PSEUDOMONAS TESTOSTERONI

1. Préparation de l'enzyme
2. Mesure de l'activité enzymatique

3. Transformation des stéroides conjugués

A - 3-sulfate d'androstènediol ——→ sulfate de déhydroépiandrostérone

B - 3-glucuronide d'androstènediol ——→ glucuronide de déhydroépiandrostérone

4. Constantes cinétiques de l'oxydation des stéroides conjugués.

A - 3-sulfate d'androstènediol

B - 3-glucuronide d'androstènediol

C - Discussion

5. Inhibition de l'oxydation des stéroides 17β-hydroxylés par les stéroides 3 ou 17 cétoniques

A - But de l'expérience

B - Moyen utilisé

C - Méthodes et résultats

D - Discussion

V - EXPERIENCES FAITES SUR LA 17β-HYDROXYSTEROIDE DESHYDROGENASE DES GLOBULES ROUGES HUMAINS.

1. But de l'expérience

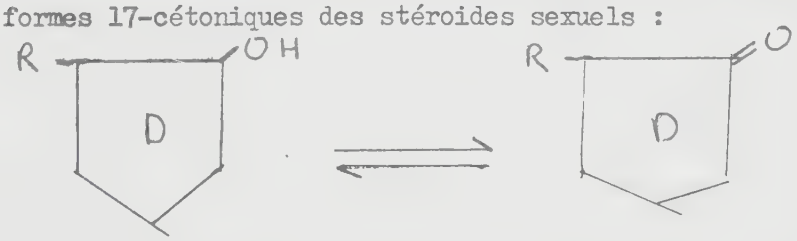
2. Méthodes et résultats

3. Discussion

I - INTRODUCTION

L'étude des 17β-hydroxystéroide oxydo-réductases (E.C. : 1.1.1.51) nous a semblé intéressante pour plusieurs raisons :

1) Ces enzymes influent sur l'équilibre entre les formes 17β-hydroxylées et les formes 17-cétoniques des stéroides sexuels :



en particulier : Oestradiol ⇌ Oestrone

Testostérone ⇌ Δ4-androstène-3,17-dione.

Etant donné que seules les formes hydroxylées semblent physiologiquement actives, l'action de ces enzymes retentit notablement sur l'effet des hormones sexuelles au niveau des organes cibles.

2) Il est actuellement connu que la distribution des 17β-hydroxy-stéroide deshydrogénases est très large. Elle offre ainsi la possibilité d'étudier des protéines catalytiques ayant le même rôle mais différant par :

- l'espèce dont elles proviennent (bactérie: le Pseudomonas Testosteroni, oiseaux : glandes uropygiennes du canard, mammifères : rat, truie, homme, etc...);

- l'organe dont elles sont extraites (foie, placenta, rein, globules rouges, etc...);

- dans une même cellule les organites subcellulaires dont elles proviennent (surnageant et microsomes de foie par exemple).

Il est donc possible d'aborder ainsi non seulement les problèmes de spécificité d'espèce et de tissu (isoenzymes) mais également de "compartimentage" et de pénétration de métabolites à travers les membranes cellulaires ou intracellulaires.

3) Des expériences in vivo ont démontré un métabolisme "direct" (sans hydrolyse préalable) des stéroides conjugués. Le résultat de ces recherches laissait prévoir que certaines 17β-hydroxystéroide deshydrogénases devaient admettre des sulfates et des glucuronides pour substrat. L'étude de ces enzymes devait donc pouvoir être un modèle pour la transformation comparée de stéroides hydrophiles (les conjugués) et lipophiles (les stéroides libres).

4) Le fait que les réactions d'oxydo-réduction catalysées par ces protéines pouvaient admettre comme co-substrats à la fois le NAD et le NADP donnait à penser qu'elles jouaient un rôle dans l'activité métabolique générale de la cellule, les transhydrogénations pouvant favoriser tantôt la production d'énergie, tantôt les synthèses.

Il nous a semblé nécessaire de faire, avant d'exposer nos quelques résultats expérimentaux, un rappel des travaux consacrés à ce groupe

d'enzymes. Nous insisterons sur l'aspect enzymologique de ces études et ne rapporterons pas les nombreux travaux faits in vivo sur le métabolisme des stéroides et comportant, entre autres transformations, l'intervention d'une 17β-hydroxystéroide deshydrogénase.

II - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A - 17β-hydroxystéroide deshydrogénase de Pseudomonas Testosteroni

En 1952, Talalay, Dobson et Tapley rapportaient qu'un microorganisme, le Pseudomonas Testosteroni, était capable d'utiliser des stéroides en C_{19} comme seule source de carbone. Par ailleurs, sa culture en présence de certains d'entre eux induisait la synthèse, entre autres enzymes, d'une 17β(3β)-hydroxystéroide deshydrogénase ou enzyme β et d'une 3α-hydroxystéroide deshydrogénase ou enzyme α.

1. Deux méthodes de purification ont été décrites :

a - Talalay (81, 101, 108) solubilise la protéine par sonication; après centrifugation les acides nucléiques du surnageant sont précipités par le sulfate de protamine. Puis l'enzyme est purifié par précipitations successives au $SO_4(NH_4)_2$ (30 % à 40 %); à l'acétone; au $SO_4(NH_4)_2$ (30 % à 40 %) de nouveau. On obtient ainsi une purification de 50 à 100 fois (activité spécifique 40.000 à 200.000 unités/mg), le rendement total est d'environ 25 %.

b - Delin et coll. (32, 98) procèdent par sonication, précipitation par le sulfate de streptomycine des acides nucléiques, précipitation par $SO_4(NH_4)_2$, filtration sur Sephadex G-100 et électrophorèse de zone. Ils obtiennent une activité spécifique de 385.000 unités/mg. Leur protéine

se révèle pure d'après les critères suivants :

- électrophorèse en disque,
- électrophorèse sur gel d'acrylamide et en veine libre,
- à l'ultracentrifugation tant pour la vitesse de sédimentation que pour l'équilibre de sédimentation.

Cette protéine a un point isoélectrique de 6,5.

L'équilibre de sédimentation permet de prévoir un poids moléculaire de 100.000 ± 600, le coefficient de friction de 1,18 semble indiquer que la molécule est approximativement sphérique.

2. Spécificité (80, 101, 103, 108, 109).

a - De substrats :

Le β-enzyme de Pseudomonas Testosteroni détermine des réactions d'oxydo-réduction pour les positions 3β OH (et 3 céto), 17β OH (et 17 céto), et à un moindre degré 16β OH (et 16 céto).

L'existence de groupements oxygénés supplémentaires en 11 ou 6 n'intervient pas; cependant l'oxydation en 17β OH ou 16β OH nécessite l'absence d'une fonction oxygénée sur le carbone voisin (c'est à dire C_{16} pour 17β OH par exemple).

La structure du noyau A n'a qu'un faible rôle (les composés phénoliques sont acceptés comme substrats), de même que l'articulation des cycles A et B (les dérivés cis, trans ou insaturés sont métabolisés).

Les fonctions alcool 3α, 6β, 11α, 11β, 16α, 17α, 20α et 21 ne sont pas oxydées par cet enzyme.

b - De coenzyme :

Seul le NAD est actif parmi les coenzymes naturels. Le NADP n'est pas réduit. Des composés artificiels (analogues aldéhyde-pyridinique et acétyl pyridinique du NAD) peuvent également être receveurs d'hydrogène.

3. Cinétique

a - Le β-enzyme ne suit pas les règles de la cinétique michaelienne pour certains stéroides. Il présente en effet le phénomène d'inhibition par excès de substrat. (Fig. 1).

Haldane (1930) d'une part, Friedenwald et Maengwyn-Davies (1954) d'autre part ont développé la cinétique de ce genre de phénomène.
En plus de l'équilibre habituel

$$E + S \underset{}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} ES \longrightarrow E + P$$

il existe un autre équilibre, dû à la possibilité pour l'enzyme de fixer une deuxième molécule de substrat donnant un complexe inactif

$$ES + S \overset{K_2}{\rightleftharpoons} ES_2$$

La vitesse de la réaction est alors donnée par la fonction (1)

$$\frac{U}{v} = 1 + \frac{K_1}{(S)} + \frac{(S)}{K_2} \qquad (1)$$

U étant une vitesse maximum théorique, obtenue si la totalité de l'enzyme était sous la forme du complexe actif ES.

Si on introduit V_o (vitesse maximum réellement observée), S_o (concentration de substrat correspondant à cette vitesse) et la constante k (telle que $k^2 = K_1 \times K_2$) on obtient la fonction (2)

$$\frac{U}{v} = 1 + k\frac{(S_o)}{(S)} + \frac{(S)}{(S_o)} \qquad (2)$$

Cette dernière fonction permet de prévoir qu'en exprimant v en fonction de log (S) on obtiendra une courbe en forme de cloche, symétrique par rapport à S_o. (Fig. 2).

Par ailleurs en exprimant $\frac{1}{v}$ en fonction de $\frac{(S_o)}{(S)} + \frac{(S)}{(S_o)}$ on obtient une solution graphique de la valeur de U et de k (ce qui permet d'obtenir K_1 et K_2 par les relations $K_1 = k\,S_o$ et $K_2 = \frac{S_o}{k}$) (Fig. 3).

Talalay (80, 101, 103, 108, 109) a pu ainsi obtenir un ensemble de constantes cinétiques pour différents substrats. (Voir tableau ci-après).

D'après les résultats de Talalay il semble que les C_{19}-stéroides ayant une fonction alcool ou cétone à la fois en C_3 et en C_{17} présentent ce phénomène d'inhibition par le substrat.

La seule exception étant les dérivés qui en plus sont hydroxylés en C_{11} (α ou β).

Avec ces derniers composés, les dérivés monohydroxylés et les oestrogènes on observe une cinétique michaelienne.

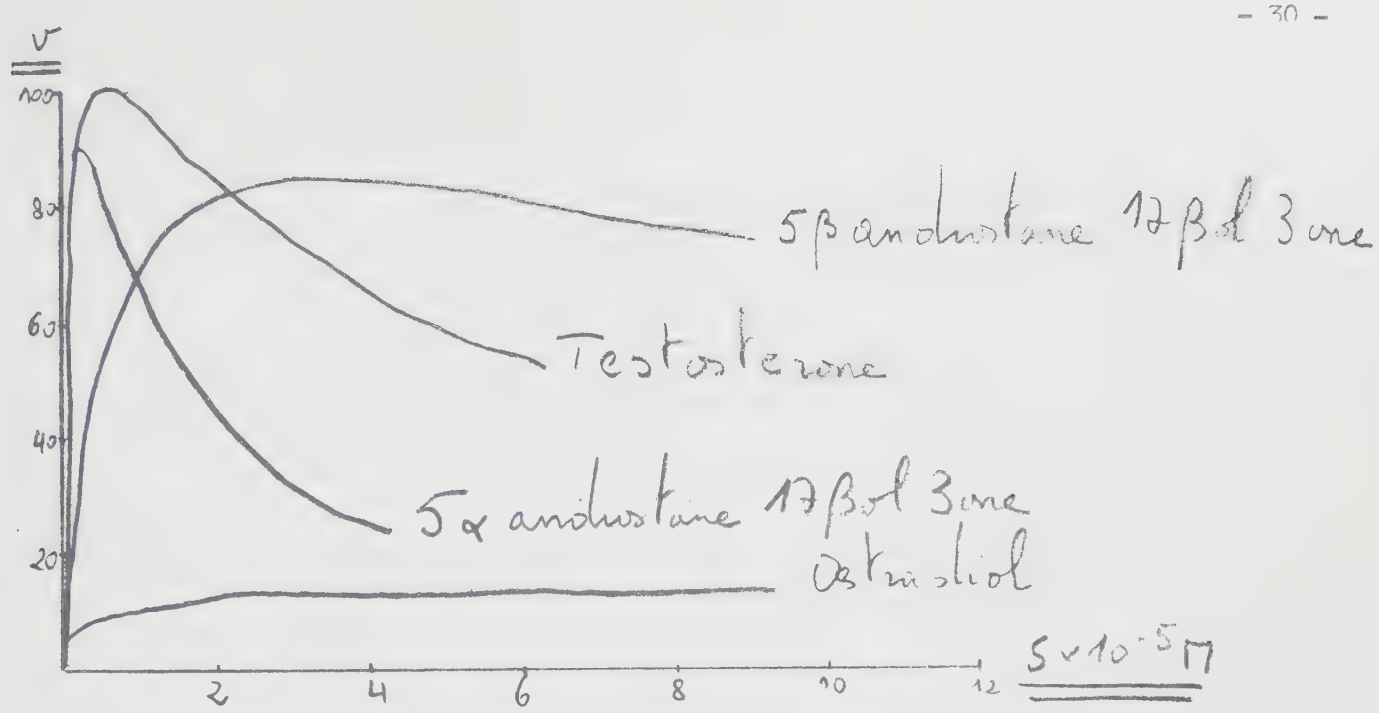

V
100
80
60
40
20
5β androstane 17β ol 3 one
Testosterone
5α androstane 17β ol 3 one
Oestradiol
2
4
6
8
10
12
S x 10⁻⁵ M

FIG. 1

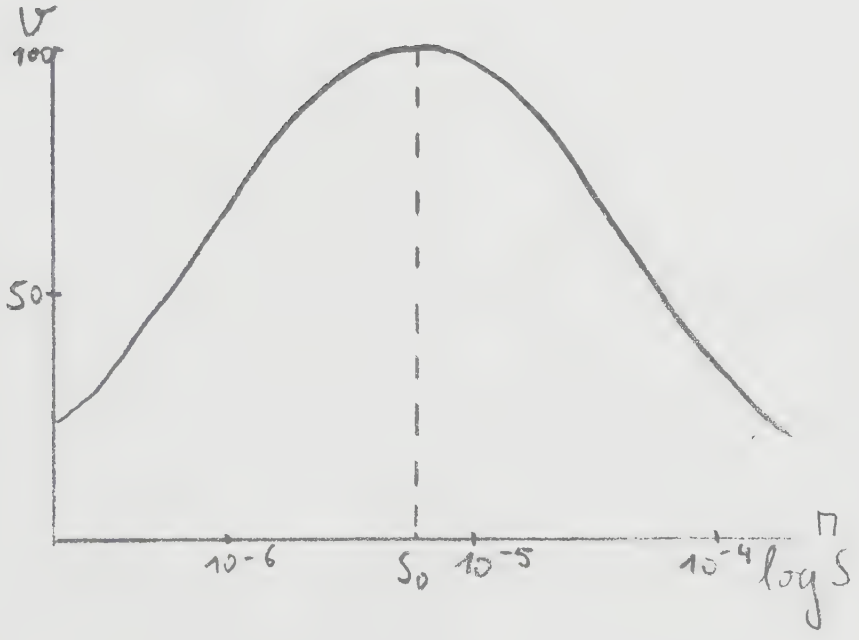

V
100
50
10⁻⁶
S₀
10⁻⁵
10⁻⁴
log S

FIG. 2

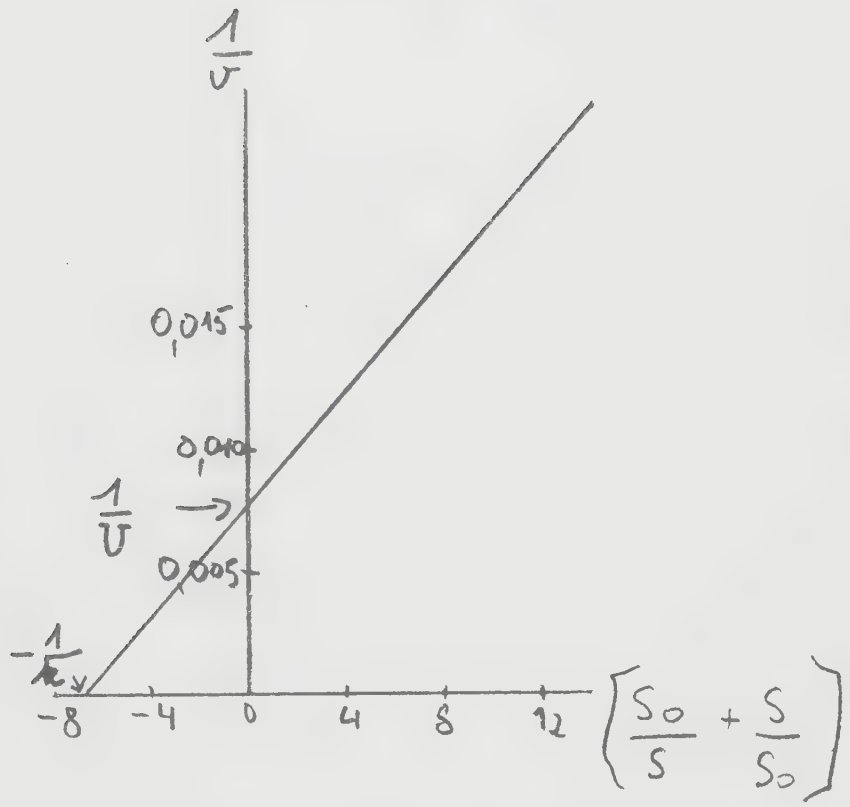


FIG. 3

Nom du substrat	S_o x 10^{-6} M	V_o	V_M	U	K_s x 10^{-6} M	k	K_1 x 10^{-6} M	K_2 x 10^{-6} M
17β HYDROXYSTEROIDES								
17β hydroxyandrosta-4-ène-3-one (testostérone)	6,0	100	-	131	-	0,154	0,93	39,0
17β hydroxy-5α androstan-3-one	3,0	90,0	-	154	-	0,357	1,07	8,41
17β hydroxy-5β androstan-3-one	35,0	84,7	-	118	-	0,196	6,86	179
17β hydroxyoestra-4-ène-3-one (19 nor testostérone)	6,7	80,0	-	122	-	0,263	1,76	25,5
11α,17β dihydroxy androsta-4-ène-3-one (11α hydroxytestostérone)	-	-	61,7	-	15,0	-	-	-
11β,17β dihydroxy-androsta-4-ène-3-one (11β hydroxytestostérone)	-	-	24,4	-	12,5	-	-	-
6β,17β dihydroxy androsta-4-ène-3-one (6β hydroxytestostérone)	6,0	96	-	124	-	0,145	0,87	41,4

Nom du substrat	S_o x 10^{-6} M	V_o	V_M	U	K_s x 10^{-6} M	k	K_1 x 10^{-6} M	K_2 x 10^{-6} M
3αHYDROXYSTEROIDES								
3β hydroxy-5α-androstane-17-one	4,0	74,6	-	142,5	-	0,454	1,82	8,8
3β hydroxy-5α-androstane-17-one	16,0	74,6	-	125	-	0,333	5,33	48,0
3β hydroxyandrosta-5-ène-17-one	10,5	17,4	-	21,0	-	0,102	1,10	100
5αandrostane-3βol	-	-	44,0	-	3,74	-	-	-
OESTRA-1,3,5(10) TRIENE								
3,17β diol (oestradiol 17β)	-	-	13,3	-	$\ll$0,5	-	-	-
3,16β diol	-	-	2,3	-	$\ll$0,5	-	-	-
17β ol	31,0	134	-	1930	-	6,67	207	4,65

b - L'étude des valeurs du K_M ou du K_1 montre que l'affinité est maximale pour les stéroides phénoliques (pour l'oestradiol $K_M \ll 0{,}5.10^{-6}$ M), intermédiaire pour les molécules sensiblement planes (Δ_4-androstène, Δ_5-androstène ou 5α-androstane $K_M \# 10^{-6}$ M), basse pour les dérivés 5β-androstane dont les cycles A et B font un angle ($K_M \# 6.10^{-6}$ M). Ces résultats ont fait avancer l'hypothèse que l'enzyme a deux sites réactifs fixant les 3β OH et les 17β OH, mais que par ailleurs tout le squelette hydrocarboné prenait part à la liaison avec l'enzyme par l'intermédiaire de liaison H.

c - Influence du pH :

La concentration en protons fait varier l'équilibre entre les formes réduite et oxydée. A pH alcalin l'équilibre est en faveur de l'oxydation, à pH acide il est en faveur de la réduction.

Ainsi à pH = 9, la testostérone est entièrement transformée en androstènedione. Les constantes d'équilibre ont été établies pour un grand nombre de composés.

4. Inhibiteurs

Le β -enzyme est inhibé par le para-mercuri-benzoate et par les incubations à fort pH dans des solutions diluées. Il est protégé de cette inhibition par le NAD et le 17β-oestradiol.

Un grand nombre de stéroides oestrogéniques exercent une inhibition compétitive envers les substrats 3β et 17β-hydroxylés. Citons le 17 -oestradiol, l'oestriol, le diéthylstilboestrol, l'hexoestrol. Par

contre le phénol n'exerce aucune action inhibitrice.

5. Mécanisme du transfert de l'hydrogène (102).

Talalay a pu démontrer en 1955 que :

a - Il y avait transfert direct de l'hydrogène entre le coenzyme et le substrat. En effet, si la réaction a lieu en présence de NADH, androstènedione et D_2O on ne retrouve pas de deutérium dans la testostérone.

b - Ce transfert est stéréospécifique, se faisant avec le côté II ou β du NAD (donc du côté opposé à celui où l'alcool deshydrogénase transfère l'hydrogène).

c - La réduction n'est pas précédée d'une énolisation.

6. Microanalyse enzymatique des stéroides.

Talalay et coll. (59, 60) ont développé un certain nombre de méthodes permettant :

- l'identification de la configuration stérique des hydroxyles en C_3 et C_{17}.
- la détermination de la pureté des stéroides.
- l'oxydation ou la réduction stéréospécifique.
- la résolution de stéroides racémiques.
- enfin et surtout le dosage de très faibles quantités de stéroides dans les milieux biologiques.

Afin que la méthode soit quantitative pour l'oxydation ils se placent à un pH très alcalin et ils utilisent un réactif qui lie les cétones,

pour la réduction ils emploient de la NADase qui en détruisant ce coenzyme pousse l'équilibre vers la formation de fonctions alcool.

B - 17β-hydroxystéroide deshydrogénase du placenta humain

La 17β-hydroxystéroide deshydrogénase soluble du placenta humain a été partiellement purifiée en 1958 par Langer et Engel (76). L'identité de cet enzyme avec la transhydrogénase oestrogéno-dépendante décrite par Hagerman et Villée (46, 116) est encore actuellement discutée.

1. Purification

Langer et Engel n'avaient obtenu en 1958 qu'une purification de 50 fois. Par ailleurs leurs solutions d'enzyme purifié étaient très instables.

En 1962 Jarabak, Adams, Williams-Ashman et Talalay (62) mirent au point une nouvelle méthode de préparation, mettant à profit la stabilisation de l'enzyme par le glycérol.

Cette purification en présence de concentrations variables de glycérol se fait en huit étapes :

- homogénéisation par sonication
- précipitation par le sulfate d'ammonium
- chauffage et agitation
- nouvelle précipitation par le sulfate d'ammonium
- deux chromatographies sur DEAE cellulose
- une chromatographie sur Ecteola-cellulose

Les auteurs obtiennent ainsi une purification de 2.500 fois avec un rendement total de 29 % et une activité spécifique de 101.000 unités/mg de protéine.

2. Spécificité

a - De substrat :

Langer et Engel (76) d'une part, Adams, Jarabak et Talalay (2) d'autre part ont étudié l'action de cette deshydrogénase sur un certain nombre de stéroides :

Elle oxyde un grand nombre de dérivés 1,3,5-estratriène ayant une fonction 17β-hydroxyl (et réduit les cétones correspondantes).

On observe une deshydrogénation minime avec les dérivés :

- oestrogéniques ayant une fonction 16 α ou 16β ol
- la 19-nor-testostérone
- la testostérone
- la 17β-hydroxy-5α-androstane-3-one

Par contre ne sont pas oxydés :

- le 17α-oestradiol
- l'oestriol
- la 17β-hydroxy-5β-androstane-3-one.

Purdy, Halla et Little (93) ont montré en 1964 que l'activité 20α-hydroxystéroide deshydrogénase exercée par les préparations purifiées de la 17β-hydroxystéroide deshydrogénase était bien due à ce dernier enzyme et non à une contamination. Ils s'appuient sur les arguments suivants :

(1) Au cours de leur purification, qui a été identique à celle décrite par Jarabak et coll., les activités 17β-deshydrogénase et 20α-deshydrogénase sont restées parallèles.

(2) Ces activités accusaient la même dénaturation par la chaleur, la même stabilisation par le glycérol, la même inhibition par le para-hydroxy-mercuri-benzoate.

(3) L'activité 20α-deshydrogénase était inhibée par le 17β-oestradiol.

b - De cosubstrat :

L'enzyme admet comme transporteurs d'hydrogène aussi bien le NAD que le NADP. Des dérivés synthétiques sont également actifs. Le 3-acétyl-pyridine adénine dinucléotide est utilisé dans les dosages car il donne des vitesses 6 ou 7 fois supérieures à celles obtenues avec le NAD ou le NADP.

3. Cinétique (77, 2)

a - Langer, Alexander et Engel ont étudié les constantes cinétiques d'un grand nombre de composés :

- la plupart d'entre eux ont une cinétique michaelienne (à 37° le K_M de l'oestrone et de l'oestradiol est d'environ $2,2.10^{-5}$ M; à 23° pour l'oestradiol il est entre 3 et $4,5.10^{-6}$ M).

- certains d'entre eux, tels que l'éther 3 méthylique d'oestrone, le 5,7,9-oestradiène 3β,17β-diol, la D L 3 desoxyéquilénine, etc... sont transformés à une vitesse plus faible à fortes concentrations. L'étude

de ce phénomène semble compatible avec l'interprétation donnée pour un phénomène semblable obtenu avec le β-enzyme de Pseudomonas Testosteroni. A fortes concentrations de substrat se forment des complexes bimoléculaires inactifs.

b - A pH 7,4, les constantes de Michaelis pour les nucléotides sont :

NAD^+ : 8.10^{-5} M

NADH : 3.10^{-5} M

$NADP^+$: 10^{-6} M

NADPH : 10^{-6} M

3 acétyl pyridine adénine dinucléotide : 5.10^{-4} M.

c - Avec le NAD et le NADP l'oxydation du 17β-oestradiol est maximale à pH 10, l'hydrogénation de l'oestrone à pH 6,2. La vitesse varie peu dans d'assez grandes marges. Certains analogues des nucléotides pyridiniques (desamino NAD, 3 acétyl pyridine desamino NAD, 3 pyridine aldéhyde NAD) ont au contraire une grande pH-dépendance.

d - La constante d'équilibre pour la réaction oestradiol ⇌ oestrone est de :

$$\frac{[\text{oestrone}]\,[\text{NADH}]\,[H^+]}{[\text{oestradiol}]\,[\text{NAD}]} = 1{,}8.10^{-8} \quad \text{à } 25°$$

4. Effecteurs

a - L'enzyme est inhibé par certains métaux lourds (H_g^{++}, Cu^{++}, Fe^{+++}), par le parachloro-mercuri-benzoate.

Il est protégé de l'inactivation par l'oestradiol, les nucléotides pyridiniques, la cystéine, le glycérol surtout (10 à 50 %). Cette dernière

propriété est utilisée pour sa préparation et pour sa conservation.

Zn^{++} (10^{-7} à 10^{-3} M) active l'enzyme.

b - Jarabak, Seeds et Talalay (63) ont étudié l'inactivation de cette 17β-hydroxystéroide deshydrogénase par le froid.

Au dessous de 10° à 15°, on note une perte d'activité, qui est contrebattue par le glycérol, les nucléotides pyridiniques et les anions polyvalents.

Cette inactivation est réversible si le refroidissement n'est pas de longue durée; si la protéine est, au contraire, laissée longtemps à basse température, l'inactivation est irréversible. On peut mettre alors en évidence par filtration sur Sephadex et électrophorèse des dérivés inactifs de haut poids moléculaire. Les auteurs pensent que le froid détruit la structure normale (peut-être en diminuant la force des liaisons hydrophobes) et favorise la formation d'aggrégats de protéines altérées.

c - Le diéthylstilboestrol ainsi que certains oestrogènes de synthèse voisins, exerce une inhibition compétitive sur la deshydrogénation. Le K_I du diéthylstilboestrol est de $5,97.10^{-6}$ M (2).

C - Transhydrogénation et 17β-hydroxystéroide deshydrogénase

En 1952-1953, Hagerman et Villée (45, 111) découvrent que l'addition de traces d'oestradiol ou d'oestrone à des incubations de placenta ou d'endomètre humains stimule l'oxydation d'un certain nombre de composés.

En 1955-1957, les mêmes auteurs et Gordon (43, 46, 115) montrèrent que les oestrogènes favorisaient la réduction du NAD (mais non du NADP) en présence d'isocitrate. Ils conclurent que ces stéroides agissaient en activant une isocitrico deshydrogénase à NAD.

En 1958, Talalay et Williams-Ashman (105) d'une part, Villée et Hagerman (116) d'autre part, s'aperçurent que l'activation de l'isocitrico-deshydrogénase n'était qu'apparente et due à l'existence d'une réaction de transhydrogénation :

(1) Isocitrate + $NADP^+$ $\rightleftharpoons$ α cétoglutarate + CO_2 + NADPH + H^+

(2) NADPH + NAD^+ $\rightleftharpoons$ $NADP^+$ + NADH

---

(3) Isocitrate + NAD^+ $\rightleftharpoons$ α cétoglutarate + CO_2 + NADH + H^+

On conçoit que si la réaction (1) est limitée par la concentration en NADP, l'existence de la réaction (2) en améliore sensiblement le rendement, la réaction (3) n'étant plus que le bilan des deux réactions précédentes.

En même temps Talalay et coll. (105) affirmaient l'identité de cette transhydrogénase oestrogéno-sensible et de la 17β-hydroxystéroide deshydrogénase, proposant comme mécanisme de transhydrogénation la suite des deux réactions suivantes :

17 -oestradiol + NAD^+ $\rightleftharpoons$ Oestrone + NADH + H^+

Oestrone + NADPH + H^+ $\rightleftharpoons$ 17β-oestradiol + $NADP^+$

NADPH + NAD^+ $\rightleftharpoons$ NADH + $NADP^+$

Depuis 1958 jusqu'à maintenant le problème n'a pas été résolu et deux écoles s'affrontent, l'une pronant l'unicité (Talalay et coll.), l'autre la dualité (Villée et coll.). Nous essayerons de résumer les arguments en faveur et contre l'identité des deux enzymes :

a - Arguments en faveur de l'identité de la transhydrogénase et de la 17β-hydroxystéroide deshydrogénase placentaire :

- au cours de leur purification Talalay et coll. ont observé dans toutes les étapes un strict parallélisme des activités de deshydrogénation et de transhydrogénation (62). Ces deux activités ne pouvaient pas être séparées lorsqu'on soumettait la protéine à des électrophorèses sur gel d'amidon, dans un gradient de densité de glycérol, à une chromatographie sur DEAE cellulose.

- la spécificité pour les stéroides des deux réactions est identique : pour la deshydrogénation comme pour la transhydrogénation, une fonction cétonique ou alcoolique en C_{17} est nécessaire (55). Ce parallélisme reste valable pour des dérivés synthétiques comme les isoestrones (56) : la 8 isoestrone est active dans les deux réactions, les autres isoestrones sont inactives.

- la spécificité pour les coenzymes est identique.

- on ne peut séparer les deux activités en traitant la protéine par la chaleur ou le froid.

- les Hollander et Brown ont établi qu'au cours de la transhydrogénation existe un temps d'induction (57) prévisible si on admet que les

stéroides servent de cosubstrats car la deshydrogénation de l'oestradiol par le NAD^+ est plus lente que la réduction de l'oestrone par le NADPH.

- la stéréospécificité des deux réactions est identique - les transferts de H se font avec le côté II du NAD.

- les deux réactions sont inhibées par le 2' AMP (5').

b - Arguments en faveur de la dualité de la transhydrogénase et de la 17β-hydroxystéroide deshydrogénase du placenta humain :

- en 1959, Hagerman et Villée (47, 48) ont affirmé avoir séparé par électrophorèse sur gel d'amidon

(une deshydrogénase à NAD^+
(
(une deshydrogénase à NADP
(
(et une transhydrogénase oestrogéno-sensible sans activité de deshydrogénation.

- en mélangeant les deux deshydrogénases ils n'obtenaient aucun effet de transhydrogénation.

- par ailleurs ils trouvèrent qu'au cours de la purification de la 17 -hydroxystéroide deshydrogénase, le rapport

$$\frac{\text{deshydrogénation}}{\text{transhydrogénation}}$$ variait,

- par le chauffage ils obtenaient une disparition plus rapide des propriétés d'oxydation que des propriétés de transfert de H, la thyroxine inhibait la deuxième réaction mais non la première.

En 1961, Glass, Lorin, Spencer et Villée (41) obtenaient un effet différentiel de certains stéroides naturels ou synthétiques sur les deux réactions.

Le diéthylstilboestrol connu pour être un inhibiteur de la deshydrogénation était, pour eux, un activateur de la transhydrogénation, à faible concentration (10^{-7} M) et un inhibiteur à plus forte concentration (3.10^{-6} M). Ces affirmations ont été niées par Talalay et coll.

Le thiol analogue du 17β-oestradiol inhibe fortement la deshydrogénation et très peu la transhydrogénation.

c - Les travaux les plus récents (1966) viennent encore compliquer le débat soit en affirmant qu'il existe plusieurs deshydrogénases ou transhydrogénases différentes, soit en introduisant la notion de polymérisation.

Karavolas et Engel (65) ont séparé par chromatographie sur hydroxyapatite deux transhydrogénases :

.La première liée à une activité 17β-deshydrogénase,

.La deuxième oestrogéno-dépendante mais dépourvue d'activité oxydante.

Par ailleurs, la première est inhibée par ClNa 1,67 M, la deuxième est activée par ce sel à la même concentration.

Crist et Warren (31) par électrophorèse séparent deux deshydrogénases dont ils pensent qu'elles sont des isoenzymes ou des composantes d'un système monomère-polymère. Les deux enzymes utilisent à la fois le NAD et le NADP, peuvent oxyder la testostérone et le 3 sulfate de 17β-oestradiol, ont une activité de transhydrogénation (mais le rapport

$\frac{\text{transhydrogénation}}{\text{deshydrogénation}}$ est différent).

Ces auteurs n'ont pas observé de transhydrogénase oestrogéno-sensible distincte et dépourvue d'activité oxydante.

Hagerman (51) a obtenu par chromatographie sur Sephadex G 100 et G 150 des arguments qui lui permettent de penser qu'existe un équilibre monomère - trimère dépendant de la concentration.

Pour la deshydrogénation le monomère serait actif et le trimère inactif.

Pour la transhydrogénation le trimère serait la forme active.

d - Rôle de la transhydrogénation :

Vers 1960-1963 de nombreux auteurs ont supposé que la transhydrogénation expliquait l'action biologique des oestrogènes (50, 107).

Hagerman et Villée pensaient que dans le tissu endocrine le facteur limitant des synthèses est la concentration en ATP or les oestrogènes favorisant le transport des hydrogènes depuis le NADP vers le NAD permettaient à ce dernier de rejoindre la voie des oxydations phosphorylantes donc de fournir de l'ATP.

Ils tiraient leurs arguments de l'existence d'une transhydrogénation oestrogéno-sensible seulement dans certains organes cibles : myomètre humain (1), placenta, endomètre, glande mammaire et hypophyse (82), alors que des tissus non réceptifs tels que foie, coeur, poumon, rein et cerveau en étaient dépourvus.

Mais de nombreuses preuves indiquent que la transhydrogénation n'explique pas l'action des oestrogènes.

. Les utérus et les placentas de rat, de porc ou de vache en sont dépourvus, alors que les hormones femelles y exercent leur action.

Jensen et Jacobson (64) ont démontré que l'oestradiol n'était pas oxydé dans l'endomètre.

. Enfin l'actinomycine et la puromycine qui agissent sur la biosynthèse des protéines bloquent l'action physiologique des oestrogènes, ce qui est incompatible avec l'hypothèse du rôle primordial et unique de la transhydrogénation. Si on ne pense plus que l'action des hormones femelles est due à la transhydrogénation, l'importance et le rôle de celle-ci ne sont pas encore élucidés.

D - Localisation histochimique de la 17β-hydroxystéroide deshydrogénase du placenta.

a - Kellogg et Glenner (66) ont trouvé en présence d'oestradiol et de NAD et de formazan une coloration intense du trophoblaste et de la décidue une coloration légère du stroma, en présence d'oestradiol et de NADP la coloration était uniquement située dans le stroma perivasculaire.

Ces constatations plaident en faveur de la thèse de Villée sur la pluralité des deshydrogénases et des transhydrogénases.

b - Koide et Mitsudo (74) avec l'oestradiol et le NAD localisent un enzyme dans le trophoblaste, le stroma et les vaisseaux , avec l'oestradiol et le NADP un autre enzyme dans les vaisseaux seulement.

avec la testostérone et des substrats de la série de l'androstane, quel que soit le coenzyme la coloration est située dans les vaisseaux uniquement.

Les auteurs pensent que deux enzymes différents oxydent l'oestradiol, un troisième la testostérone.

c - Botte, Materazzi et Chieffi (25) ont trouvé la 17β-deshydrogénase du placenta et des membranes foetales du rat localisée dans les cellules trophoblastiques géantes de la première et de la seconde générations ainsi que dans les cellules endodermiques du suc vitellin.

E - La 17β-deshydrogénase des globules rouges.

a - Les premiers résultats expérimentaux obtenus à l'aide d'incubations de stéroides semblaient contradictoires : Werthessen et coll. obtenaient (121, 122) une disparition de la fonction cétonique de l'oestrone avec diminution de l'activité biologique, alors que Bischoff et coll. (22, 23) observaient une augmentation du pouvoir biologique. L'explication de cette divergence était dans un métabolisme différent selon les espèces en cause :

Werthessen se servait de sang de bovidé dans lequel il mettait en évidence :

- une 17β-deshydrogénase transformant le 17β-oestradiol en oestrone (5)
- et une 17α-deshydrogénase transformant l'oestrone en 17α-oestradiol (6). Deux autres produits phénoliques obtenus n'étaient pas identifiés.

Par contre Bischoff (44) utilisait les globules rouges de lapin et d'homme mettant surtout en évidence une 17β-deshydrogénase transformant

l'oestrone en 17β-oestradiol.

b - Il semble tout au moins dans l'espèce humaine que l'activité enzymatique soit localisée dans les éléments figurés et non dans le plasma (ainsi Dowben et Rabinowitz (33) n'ont obtenu aucune transformation de 17β-oestradiol en oestrone par incubation en présence de sérum).

c - Portius et Repke (91) ont en 1960 systématiquement abordé les problèmes des différences selon les espèces :

- ils ont trouvé une 17β-deshydrogénase dans 15 espèces dont l'homme, une 17α-deshydrogénase chez le taureau, le mouton et la chèvre.

- l'activité de la 17β-deshydrogénase variait selon les espèces : elle était la plus forte chez le rat, la plus faible chez l'homme.

Les auteurs n'ont pas noté de différence entre les espèces dont les globules rouges sont nuclées et celles dont les globules rouges sont anuclées.

- ils ont particulièrement étudié l'enzyme de rat (92) : à pH 7,4 l'équilibre était 78 % de 17β-oestradiol et 22 % d'oestrone.

d - Migeon et coll. (85, 86) ont étudié la 17β-hydroxystéroide deshydrogénase des globules rouges humains. Ils ont établi qu'il s'agissait d'un enzyme à NADP. Le NADPH nécessaire à la réduction de l'oestrone provenait de l'oxydation du glucose. Chez les individus dépourvus de glucose 6 phosphate deshydrogénase, cette réduction ne pouvait avoir lieu que si du NADPH était ajouté au milieu d'incubation.

L'activité enzymatique était solubilisée après hémolyse des globules rouges, mais pour se manifester elle nécessitait alors du glucose 6 phosphate et du NADP.

Cette activité n'était pas diminuée lorsqu'on éliminait les membranes erythrocytaires ("ghosts"); par contre elle devenait très faible en présence de plasma. Les auteurs pensent que ce fait est dû à l'attachement du stéroide sur les protéines, ce qui empêche son accès au globule rouge.

Migeon et coll. ont entrepris également un début de purification de l'enzyme par précipitation sur $SO_4(NH_4)_2$ 25 à 50 % et chromatographie sur DEAE.

F - Les 17β-hydroxystéroide deshydrogénases du foie.

a - De nombreux auteurs ont obtenu à l'aide d'homogénats de foie des interconversions de stéroides supposant l'intervention des 17β-deshydrogénases :

Ryan et Engel ont obtenu chez le rat et chez l'homme une interconversion oestrone - oestradiol 17β (96).

Axelrod et coll. ont obtenu de l'androstènedione en perfusant un foie de chien avec de la testostérone (4).

Stylianou (99) et Breuer (26) ont obtenu les mêmes résultats pour l'oestrone, l'oestradiol et la testostérone avec des homogénats de foie humain.

Kochakian et coll. (71, 72, 73, 70) ont obtenu, avec des homogénats de foie de cobaye, une oxydation de la testostérone, de l'étiocholane-17β-ol-

3-one. La deshydrogénation de l'androstane-17β-ol-3-one était beaucoup moins prononcée, alors que les dérivés monohydroxylés (androstane-17β-ol) n'étaient pas modifiés.

Crépy et Jayle (30) ont observé une réduction du sulfate de déhydro-épiandrostérone en 3-sulfate d'androst-5-ène-3β,17β-diol.

Pearson et Grose (89) ont montré par une méthode histochimique l'existence d'une 17β-hydroxystéroide deshydrogénase dans le foie de rat.

b - Chez seulement deux espèces ont été entreprises des études réellement enzymologiques :

(1) En 1950 Sweat, Samuels et Lumry (100) ont partiellement purifié l'enzyme hépatique de truie.

L'homogénat était centrifugé à 20.000 g. pendant une heure.

Le surnageant était conservé et précipité par le $SO_4(NH_4)_2$. La fraction précipitant entre 50 % et 100 % de saturation était conservée.

Les caractères de la (ou des) protéine préparée par Sweat étaient un pH optimum de 8,3, une température favorable aux environs de 30° - 33°.

Le seul cosubstrat accepté était le NAD, aucun métal ne semblait nécessaire à l'activité enzymatique.

L'affinité pour la testostérone était donnée par un K_m de $3,3.10^{-5}$ M.

(2) Les équipes de Kochakian (36, 37,), Villée (118), Engel (39) ont étudié les enzymes du foie de cobaye.

(a) : Kochakian et coll. (36) ont décrit la séparation par centrifugation à 24.500 g. pendant une heure d'un enzyme à NAD contenu dans le précipité

et d'un enzyme à NADP contenu dans le surnageant mais précipitable par 60 % à 75 % de $SO_4(NH_4)_2$.

Dans un autre travail ils ont pu établir que le premier enzyme était microsomial (3).

Villée décrit une troisième protéine située dans la fraction soluble acceptant comme cosubstrat à la fois le NAD et le NADP. On la distingue de l'autre enzyme du surnageant car elle précipite à une saturation inférieure à 40 % de $SO_4(NH_4)_2$.

(b) La 17β-hydroxystéroide deshydrogénase soluble à NADP a été bien étudiée.

Endahl et Kochakian (37) l'ont purifiée cinq fois en reprenant le surnageant d'une centrifugation à 105.000 g. par le sulfate d'ammonium (50 % à 60 %), puis en faisant une chromatographie sur DEAE cellulose.

Ils ont également obtenu la même purification par électrophorèse sur papier.

Engel et coll. (39) ont eux obtenu une purification de 200 à 230 fois par précipitation au $SO_4(NH_4)_2$, chromatographie sur DEAE cellulose puis hydroxyapatite.

Le pH optimum de l'enzyme varie selon les auteurs entre 9,6 et 10,3.

L'activité diastasique ne nécessite la présence d'aucun métal, mais les groupements thiols doivent être libres (39).

La spécificité semble assez large; l'enzyme admettant comme substrats :

- la testostérone (K_M = 5,6.10^{-5} M ou 6.10^{-5} M)
- l'étiocholan-17β-ol-3-one (K_M = 2,07.10^{-5} M)
- l'androstan-17β-ol-3-one (K_M = 1,08.10^{-5} M)
- les 3β hydroxystéroides de la série 5α

(c) La 17β-hydroxystéroide deshydrogénase microsomiale à NAD a pu être solubilisée par des traitements au Triton X-100, Duponol C et Desoxycholate. Son pH optimum est également de 9,6, le K_M pour la testostérone est de 8,35.10^{-5} M.

G - Rein

Dowben et Rabinowitz (33) ont montré que le rein pouvait transformer le 17β-oestradiol en oestrone. Velle et Erichson (114) ont confirmé cette réaction et obtenu la réaction inverse.

Kochakian et coll. (3, 73) ont prouvé que les systèmes enzymatiques rénaux utilisaient aussi bien le NAD que le NADP, qu'ils étaient contenus uniquement dans le surnageant pour un grand nombre d'espèces.

H - Testicule

Inano et Tamaoki (61) ont trouvé une 17β-hydroxystéroide deshydrogénase dans les microsomes de testicule de rat.

Payne et Mason ont démontré la transformation directe du sulfate de déhydroépiandrostérone en 3-sulfate d'androst-5-ène-3β,17β-diol (87) par

des extraits solubles de testicule de rat.

De nombreuses études histochimiques ont été faites mettant en évidence une 17β-deshydrogénase dans le mésenchyme de la crête génitale humaine (10), établissant que dans le testicule l'activité était liée aux cellules de Leydig et admettait le NAD et le NADP comme cosubstrats (11).

Hathaway et West (53) ont obtenu une conversion du 17β-oestradiol en oestrone et de la testostérone en androstènedione par les spermatozoïdes de chien et d'homme. Le liquide séminal dépourvu de spermatozoïdes était inactif.

Les enzymes étaient dans le surnageant après une centrifugation à 80.000 g. du sonicat.

I - Autres organes

Les 17β-hydroxystéroide deshydrogénases ont été décrites dans de nombreux organes, en particulier par des méthodes histochimiques. Le détail en est donné par Baillie et coll. (90). Citons la prostate (88), la surrénale (84, 28), la peau (8, 42, 95), les glandes uropygiennes du canard (9), les muscles squelettiques (67), l'ovaire, le tractus digestif (9).

III. - MATERIEL ET METHODES GENERALES

1. Liste des abréviations et conventions utilisées dans ce travail

A - Stéroides

Symboles	Noms usuels	Nomenclature Systématique
	Testostérone	17β-hydroxy- Δ_4-androstène-3-one
	Androstènedione	Δ_4-androstène-3,17-dione
DHA	Dehydroépiandrostérone	3β-hydroxy- Δ_5-androstène-17-one.
	Androstènediol	Δ_5-androstène-3β,17β-diol.
	Oestradiol	oestra-1,3,5(10)-triène-3,17 -diol
	Oestrone	3-hydroxyoestra-1,3,5(10)-triène-17-one
	Sulfate	Ester sulfate
	Glucuronide	β-D-glycopyranuronoside

B - Divers

Symboles	Noms usuels	Nomenclature Systématique
NAD		Nicotinamide-adénine-dinucléotide
NADP		Nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate
	17β-hydroxystéroide deshydrogénase	17β-hydroxystéroide NAD(P) oxydo-réductase (E.C. 1.1.1.51).

2. Matériel et produits utilisés

A - Stéroides purs non radioactifs

a - Stéroides libres

- Testostérone UCLAF
- Androstènedione UCLAF
- Oestradiol UCLAF
- Oestrone UCLAF

b - Les stéroides conjugués sont dus à l'obligeance de R. Emiliozzi qui les a synthétisés (35, 14).

- Glucuronide de testostérone
- Glucuronide de déhydroépiandrostérone
- 3-glucuronide d'androstènediol
- Sulfate de déhydroépiandrostérone
- 3-sulfate d'androstènediol
- Diglucuronide d'androstènediol

B - Autres produits utilisés

- NAD et NADP (Sigma Chemical Company)
- βhydroxystéroide deshydrogénase, Type I (Sigma Chemical Company)
- Dioxane (Merck)
- Gel de silice : GF_{254} (Merck)
- Gel de silice G (Merck)
- Sephadex G-100 (Pharmacia)

- Suc digestif d'Helix Pomatia (Industrie Biologique Française)
- Sulfate d'ammonium (Prolabo)
- Sulfate de protamine (Mann)

C - Appareils

- Centrifugeuse réfrigérée M.S.E.
- Spectrophotomètre Beckman DB avec enregistreur automatique
- Incubateur (Precision Scientific Co)
- Homogénéisateur Potter (Moteur Bodine Electric Company)

3. Méthodes générales

A - Composition des tampons utilisés

- tampon pyrophosphate de Na pH : 8,9 0,1 M
- tampon phosphate de Na pH : 7

  0,003 M EDTA

  0,05 % β mercaptoéthanol

  20 % glycérol

  0,05 M phosphate de K (pour 1 litre : 250 ml de PO_4KH_2 0,2 M et 155,5 ml de KOH 0,2 N).

- tampon phosphate de K pH : 7,2

  0,0206 M PO_4HK_2

  0,0094 M PO_4H_2K

  0,001 M EDTA préalablement tamponné à pH : 7,2

B - Hydrolyse enzymatique des glucuroconjugués

La phase aqueuse contenant les stéroides est ajustée à pH 5 avec de l'acide acétique. On ajoute 10 % de tampon acéto-acétique pH 5 2M et 1 % de suc digestif d'Helix Pomatia. Le mélange est placé dans une étuve à 37° pendant 48 h. Au bout de 24 h. on ajoute 0,5 % de la préparation enzymatique. On refroidit On extrait au dichlorométhane (1 fois pendant 1 h 30 volume à volume, 2 fois pendant 1 h 30 par 1/2 volume).
Le dichlorométhane est lavé (NaOH N 1/10° volume; eau distillée 1/10° volume), puis séché sur SO_4Na_2 et évaporé.

C - Solvolyse des sulfates de stéroides

On ajoute 20 % de ClNa. On ajuste à pH : 1 par SO_4H_2 concentré. On extrait 3 fois 1 heure par de l'acétate d'éthyle volume à volume. L'acétate d'éthyle est conservé pendant une nuit à 37°. Le lendemain il est refroidi, lavé avec NaOH N (1/10° volume) 2 fois et l'eau distillée (1/10° volume) jusqu'à neutralité des eaux de lavage. On deshydrate sur SO_4Na_2 et on concentre.

D - Chromatographie descendante sur papier (système ligroïne - propanediol)

La feuille de papier Whatman n° 1 est trempée dans un mélange Méthanol (30 cc) - Propanediol (30 cc). Elle est essorée. On dépose les extraits et les témoins. Après équilibration on fait couler la chromatographie 20 h. environ.

Les feuilles sont séchées à 60° et révélées, soit par le réactif de Zimmerman, soit par le $SbCl_3$ (solution saturée dans acide acétique glacial).

E - Chromatographie en couche mince sur plaque

a - Préparation des plaques

On dissout 30 g de Silica gel G dans 60 ml d'eau. On le verse sur des plaques de 10 x 24 cm afin d'obtenir une épaisseur de 0,3 à 0,6 mm. On sèche à l'étuve à 100° pendant une heure.

b - Après dépôt des extraits et des témoins, on fait migrer jusqu'à ce que le fond du solvant ait atteint le bord supérieur de la plaque. Séchage et révélation par pulvérisation de réactif anisique (aldéhyde anisique 0,5 ml, 50 ml d'acide acétique, 1 ml de SO_4H_2 concentré).

F - Chromatographie d'adsorption sur colonne de silice

Une colonne de 10 cm de long et 0,8 cm de diamètre est remplie d'hexane. On fait tomber en pluie un mélange de 2 g de silice (0,2 - 0,5 mm) et de 0,50 g de célite. On tasse la colonne et on laisse s'écouler le trop-plein de solvant.

L'extrait est dissous dans un mélange de 0,3 ml de benzène et 7,2 ml d'hexane qu'on laisse s'écouler. Puis on élue par des fractions successives de 20 cc de :

1. hexane pur
2. benzène pur
3. benzène 19 ml - acétate d'éthyle 1 ml
4. " 17 ml - " " 3 ml
5. " 15 ml - " " 5 ml
6. " 15 ml - " " 5 ml
7. " 10 ml - " " 10 ml
8. acétate d'éthyle pur.

Les stéroides qui nous intéressent (déhydroépiandrostérone et androstènediol) sortent en général dans la fraction 6.

IV. - EXPERIENCES FAITES SUR LA 17β - HYDROXYSTEROIDE DESHYDROGENASE DE PSEUDOMONAS TESTOSTERONI

1. Préparation de l'enzyme

(a) Sans purification

Environ 300 mg de poudre de Pseudomonas Testosteroni (Sigma) sont broyés dans un Potter en présence de 1 ml de tampon pyrophosphate pH : 8,9. L'opération est répétée 4 fois, l'appareil étant maintenu dans de la glace.

Les 4 ml d'extrait obtenu sont centrifugés à 4° pendant 20 minutes à 6.000 g. Le surnageant obtenu est légèrement coloré en jaune. Il a été utilisé immédiatement, quelquefois conservé 7 jours à -20°. Au cours de cette conservation on n'observe aucune perte d'activité.

(b) Avec purification

On utilise la méthode de Delin et coll. (1) : (toutes les opérations sont effectuées à 4°).

(1) Extraction : 20 g de poudre lyophylisée de Pseudomonas Testosteroni cultivé et induit selon la technique de Talalay (7) sont utilisés.

Environ 3,5 g (1/6° de la quantité totale) sont broyés au Potter en présence de 15 ml de tampon phosphate pH : 7, puis rebroyés en présence de la même quantité de tampon. L'opération est répétée pour les autres

fractions de poudre. L'appareil est rincé et le volume complété à 212 ml.

Agitation magnétique pendant 2 h.

Centrifugation à 20.000 g. pendant une heure.

Le précipité est resuspendu dans 100 ml de tampon. Agitation magnétique pendant une nuit. Nouvelle centrifugation identique.

Les deux surnageants sont réunis (250 ml au total).

(2) Précipitation des acides nucléiques : on ajoute 280 mg de sulfate de protamine dans 14 ml de tampon phosphate pH : 7 (1/5° du poids de protéine, sous forme de solution de 20 mg/ml environ).

On laisse reposer une heure. Puis on centrifuge pendant 10 minutes à 7.000 g.

Le surnageant (256 ml) est recueilli.

(3) Précipitation par le sulfate d'ammonium : on ajoute 35,8 g de sulfate d'ammonium (140 g/litre). On laisse reposer pendant la nuit. On centrifuge à 20.000 g. pendant 20 minutes.

Le surnageant mesure 269 ml, on y ajoute 75,6 g de $SO_4(NH_4)_2$ (soit 280 g/l). On laisse reposer pendant la nuit. On centrifuge pendant 20 minutes à 20.000 g. Le précipité est repris par 12 ml de tampon phosphate pH : 7,2.

(4) Dialyse pendant 48 h. contre le tampon phosphate pH : 7,2. A la fin de la dialyse on obtient 105 ml de produit.

On concentre par ultrafiltration à 30 ml.

(5) Chromatographie sur Sephadex G-100 : colonne de 1 m x 3 cm de diamètre.

Vitesse d'écoulement 15 ml/h.

Volume d'exclusion ("void" volume) mesuré au bleu dextran : 190 ml.

(6) Résultat final : deux chromatographies sont faites avec chacune la moitié du produit de la dialyse.

Avec la première on obtient dans 105 ml une concentration protéique de 0,045 mg/ml et une activité enzymatique totale de $6,2.10^5$ unités. L'activité spécifique est de $3,07.10^3$ unités/mg de protéine.

Un résultat comparable est obtenu avec la deuxième moitié du produit. Certaines fractions ont une activité spécifique de $1,87.10^4$ unités/mg.

2. Mesure de l'activité enzymatique

La méthode utilisée par Talalay (10) a été adoptée, la seule modification étant une augmentation de la concentration de cofacteur présent dans le milieu.

La réaction a lieu dans une cuvette en quartz de 3 ml. On ajoute :

(1) 1 ml de tampon pyrophosphate pH : 8,9

(2) 0,1 ml d'une solution de NAD (5 µM)

(3) le stéroide.

. en solution dans de l'eau bidistillée s'il s'agit d'un stéroide conjugué.

. en solution dans 0,02 ml de dioxane purifié s'il s'agit d'un stéroide libre.

(4) on complète avec de l'eau bidistillée à un volume total de 2,9 ml.

La lecture se fait contre un blanc contenant tous les éléments précédents à l'exclusion de l'enzyme.

La réaction commence lors de l'addition de 0,1 ml de solution enzymatique. Elle se fait à la température du laboratoire et est suivie sur l'augmentation de l'absorption à 340 mμ (enregistrement automatique).

Une unité enzymatique détermine une variation de 0,001 de la densité optique par minute lorsque le substrat est la testostérone. Cependant, pour des raisons cinétiques (inhibition par excès de substrat) la testostérone a été abandonnée comme substrat de référence et l'oestradiol utilisé. Son oxydation se faisant à une vitesse plus faible il faut multiplier par 7,5 les variations de densité optique observées au tout début de la réaction (vitesse initiale).

3. Transformations des stéroides conjugués

A - Transformation du 3-sulfate d'androstènediol en sulfate de déhydro-épiandrostérone.

Les preuves de cette transformation sont la réduction du NAD et la caractérisation du stéroide obtenu.

a - Réduction du NAD

L'incubation de 100 γ de stéroide, dans les conditions précédemment décrites, avec l'enzyme purifié détermine une augmentation de la densité optique à 340 mμ objectivant la réduction du NAD^+ en NADH (Fig. 4).

FIG 4

Des expériences-témoin montrent qu'en l'absence soit de stéroide, soit de NAD, soit d'enzyme, il n'y a aucune variation de la densité optique.

b - Identification du sulfate de déhydroépiandrostérone

(1) les produits de trois incubations (100 γ de substrat dans chaque expérience) sont traités de la façon suivante :

aux 3 ml d'incubat sont ajoutés 17 ml d'eau. La solution est extraite une fois par 40 ml, 2 fois par 20 ml de dichlorométhane pendant 1 h 30.

Le dichlorométhane est lavé 2 fois par 10 ml d'eau, deshydraté sur sulfate de sodium, évaporé en vue d'être chromatographié. Il contient les stéroides libres.

La phase aqueuse contient les sulfates. On les soumet à la solvolyse. On obtient ainsi un extrait pouvant être chromatographié.

Sur les chromatographies on dépose d'une part le premier extrait (stéroides libres), d'autre part le deuxième extrait (stéroides conjugués maintenant hydrolysés).

(2) le produit de la première incubation est chromatographié sur papier dans le système ligroïne - propanediol (écoulement 20 h.) face à des témoins d'androstènediol et de déhydroépiandrostérone. Révélation au $SbCl_3$. Aucune tache n'est retrouvée dans la colonne où auraient dû se trouver les éventuels stéroides libres. Dans la colonne où migrent les stéroides provenant de la solvolyse des sulfates aucune tache n'est retrouvée face à l'androstènediol, par contre une tache fortement colorée se

trouve au niveau de la déhydroépiandrostérone.

(3) le produit de la deuxième incubation est chromatographié dans les mêmes conditions mais la révélation est faite au réactif de Zimmerman. Une seule tache est retrouvée migrant au niveau de la déhydroépiandrostérone et correspondant aux sulfates de stéroides solvolysés.

(4) le produit de la troisième incubation est chromatographié sur plaque de silicagel dans le système benzène 3 - acétate d'éthyle 2, en présence de témoins (androstènediol et déhydroépiandrostérone). La révélation au réactif anisique montre l'absence de tout stéroide libre, une seule tache est obtenue dans la colonne, correspondant aux sulfates de stéroides hydrolysés. Elle se trouve au niveau de la déhydroépiandrostérone témoin.

Au total : l'incubation de 3-sulfate d'androstènediol en présence de 17β-hydroxystéroide deshydrogénase de Pseudomonas Testosteroni entraîne la réduction du NAD. A l'issue de l'incubation aucun stéroide libre n'est retrouvé; le seul stéroide conjugué obtenu s'avère après solvolyse avoir la mobilité chromatographique de la déhydroépiandrostérone dans deux systèmes différents. Il est coloré par le réactif de Zimmerman de façon identique à la déhydroépiandrostérone, ce qui montre qu'existe une fonction cétonique en C_{17}.

Il est probable que la réaction observée est :

3-sulfate d'androstènediol + NAD^+ $\rightleftharpoons$ sulfate de déhydroépiandrostérone + NADH + H^+

Cette réaction est totale (pas de sulfate d'androstènediol retrouvé après incubation) et se fait sans hydrolyse du sulfate de stéroide (pas de stéroide libre retrouvé).

B - Transformation du 3-glucuronide d'androstènediol en glucuronide de déhydroépiandrostérone.

Les expériences ont été identiques à celles effectuées avec le sulfate d'androstènediol (la seule différence étant que l'hydrolyse du glucuronide obtenu après incubation a été faite à l'aide de suc digestif d'Helix Pomatia).

Ici également a été obtenue une réduction du NAD. Un seul stéroide a été isolé après l'incubation. Il s'agissait d'un glucuronide qui après hydrolyse enzymatique avait une migration chromatographique identique à celle de la déhydroépiandrostérone dans deux systèmes différents (sur papier dans le système ligroïne - propanediol, sur silicagel dans le système benzène 3 - acétate d'éthyle 2) et était colorable par le réactif de Zimmerman.

Nous pensons donc avoir obtenu la réaction :

3-glucuronide d'androstènediol + NAD^+ glucuronide de déhydroépiandrostérone + NADH + H^+.

Cette réaction a été totale et ne s'est pas accompagnée d'hydrolyse des stéroides conjugués.

C - La discussion de ces résultats sera faite après l'exposé de résultats semblables obtenus à l'aide de la 17β-hydroxystéroide deshydrogénase de globules rouges humains.

4. Constantes cinétiques de l'oxydation des stéroides conjugués.

Les expériences ont été faites à l'aide d'enzyme non purifié.

A - 3-sulfate d'androstènediol

a - la cinétique est michaelienne. On n'observe pas d'inhibition par excès de substrat (phénomène observé pour un grand nombre de stéroides libres).

Concentration de substrat x 10^{-6} M	Vitesse initiale
9,4	6 6
18,8	19
28,2	24 25
37,6	27 27
56,4	30 31 29
94	30 31
282	35 35
376	33 33
564	35

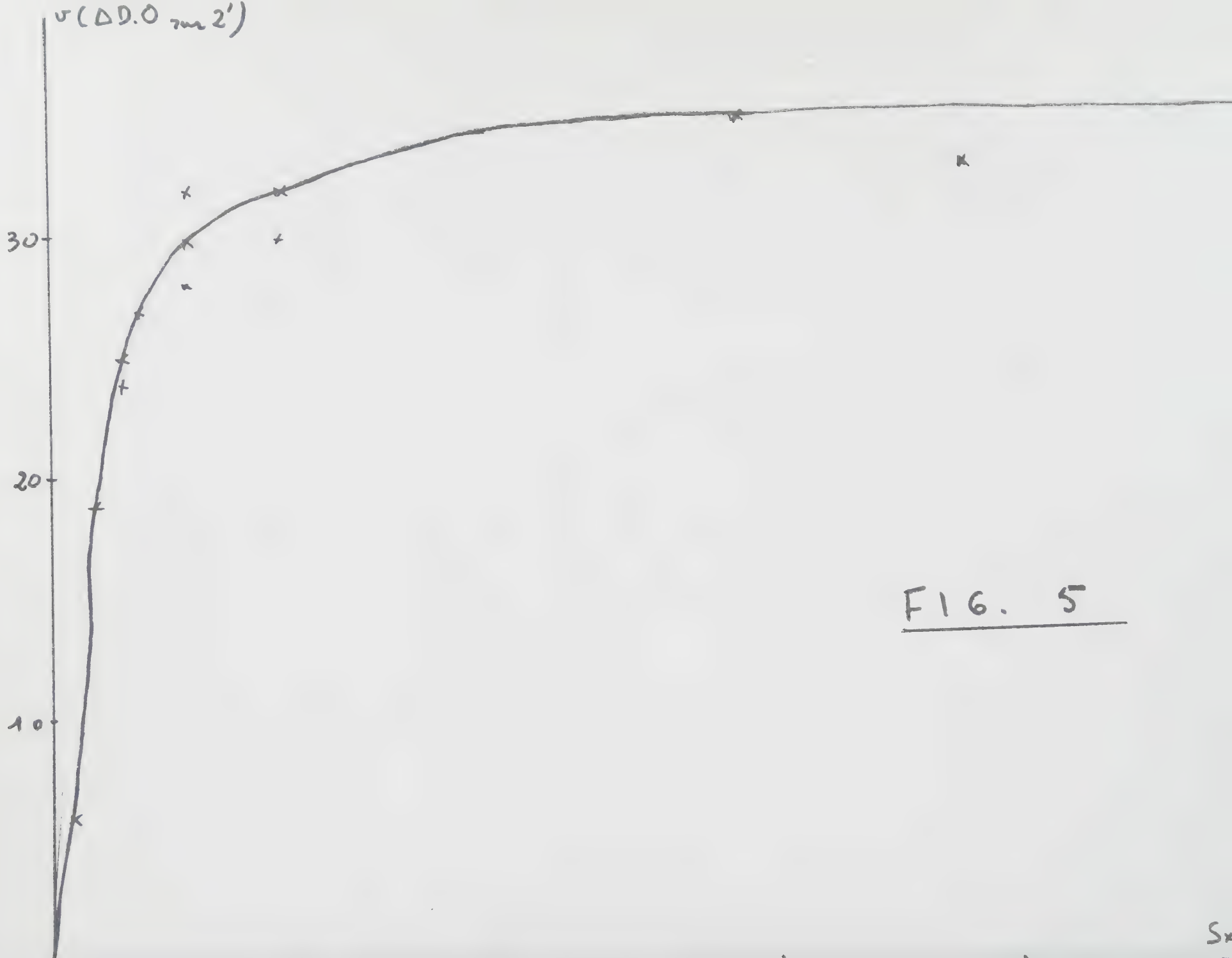


FIG. 5

b - la constante de Michaelis K_M est d'environ 2.10^{-5} M (Fig. 6)

c - la vitesse maximum (si on prend comme référence $V_{o\ testostérone} = 100$) est de 70 environ.

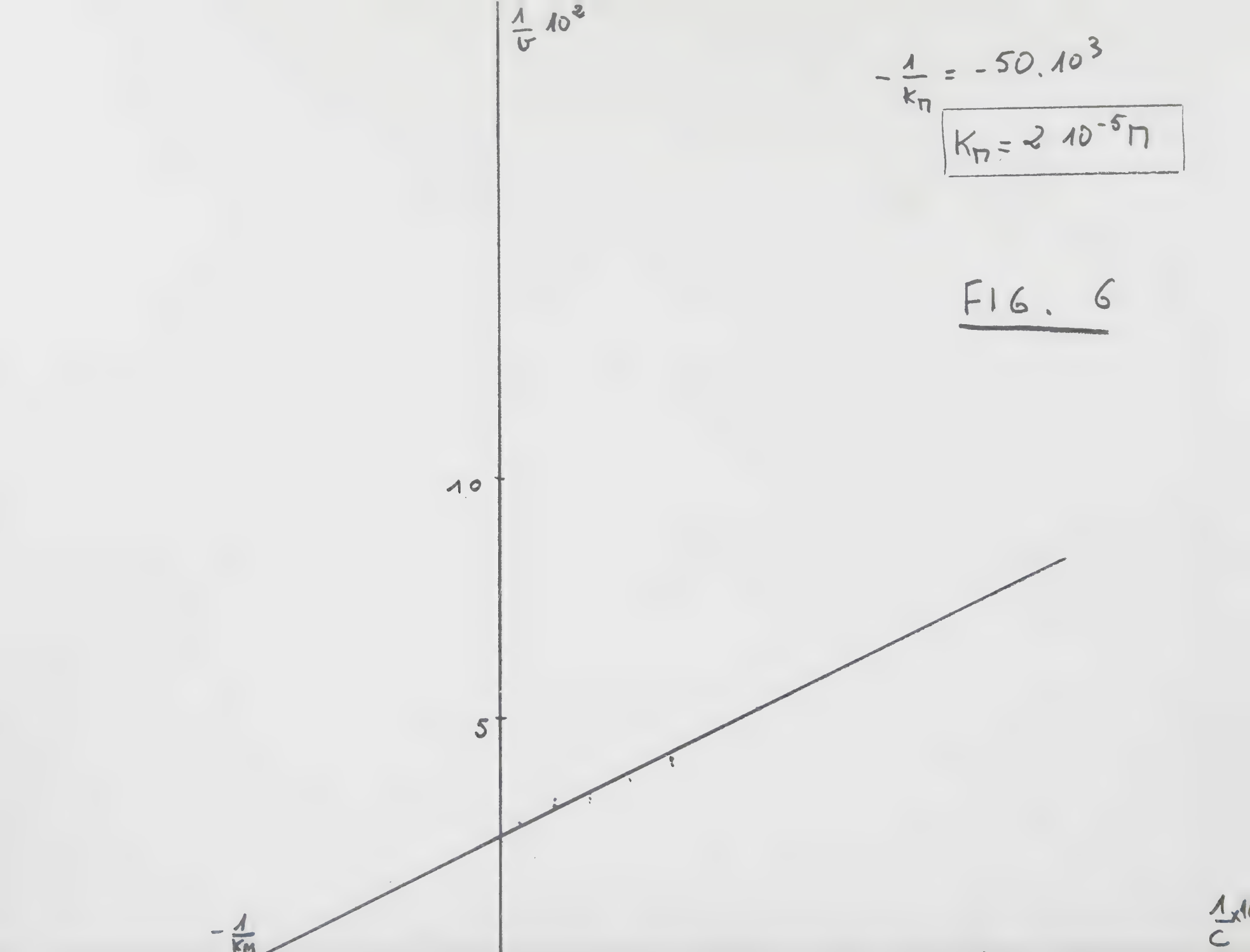
$V_{o\ testostérone}$ (voir Bibliographie III, 1) est obtenue expérimentalement en multipliant par 7,5 la vitesse maximale observée pour le 17β-oestradiol.

B - 3-glucuronide d'androstènediol

a - la cinétique est également michaelienne. (Fig 7)

Concentration de substrat x 10^{-5} M	Vitesse initiale
0,83	14 13
2,5	27,5 29
3,3	31 33
5	35 36
6,66	36 35

b - la constante de Michaelis est d'environ $K_M = 2,5.10^{-5}$ M (Fig. 8).



$$-\frac{1}{k_n} = -50.10^3$$

$$K_n = 2\ 10^{-5}\ n$$

FIG. 6

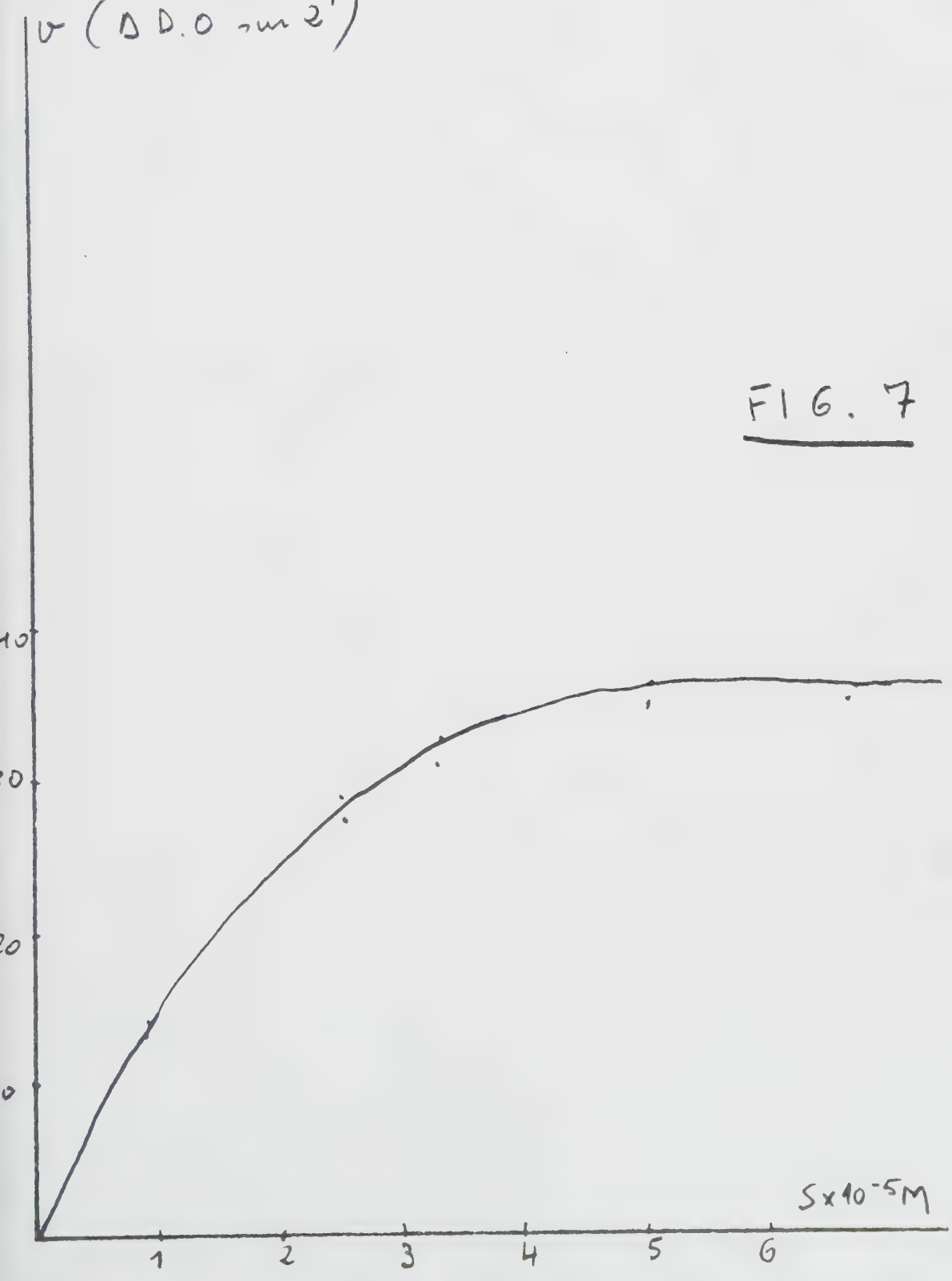
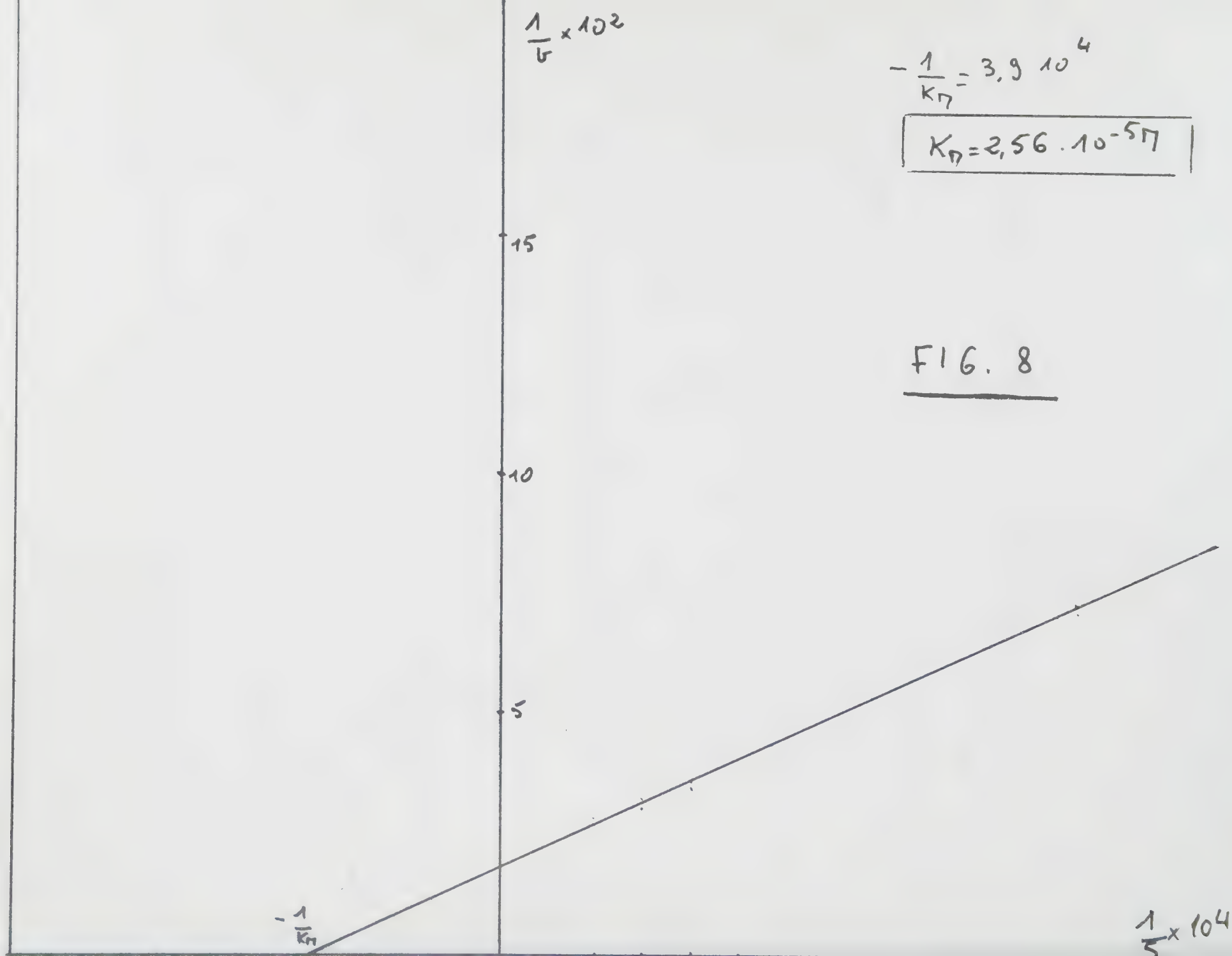


FIG. 7



$-\frac{1}{K_m} = 3,9\ 10^4$

$K_m = 2,56 \cdot 10^{-5}$ M

FIG. 8

c - la vitesse maximum (par rapport à $V_{o\ testostérone} = 100$) est d'environ 40.

C - Discussion

a - L'affinité de l'enzyme pour les stéroides conjugués semble 10 fois plus faible que l'affinité pour les stéroides libres.

En effet le K_M pour les conjugués est d'environ 10^{-5} M, alors que le K_M pour les stéroides libres (de la série C_{19}) est d'environ 10^{-6} M (103).

b - Par contre la vitesse de la réaction, à saturation de substrat, est à peu de chose près, identique pour les deux types de stéroides.

5. Inhibition de l'oxydation des stéroides 17β-hydroxylés par les stéroides 3 ou 17 cétoniques.

A - But de l'expérience

. D'une part essayer de préciser si les oxydo-réductions portant sur les carbones 17 et 3 se font sur une ou plusieurs protéines semblables, sur des sites différents ou identiques.

. D'autre part avoir les mêmes renseignements quant aux transformations comparées des stéroides libres et conjugués.

B - Moyen utilisé

La réversibilité de l'oxydation des fonctions 17β-hydroxyle, les

premiers résultats expérimentaux indiquant que les oxydations étaient inhibées par le produit de la réaction, nous ont incliné à penser que le stéroide s'attachait sur l'enzyme, entre autres, soit par une fonction hydroxyle en 17, soit par une fonction cétone en 17.

Les constatations sont identiques pour les fonctions 3β ol et 3 cétoniques.

La mise en évidence d'une inhibition compétitive de l'oxydation d'une fonction alcool en 17β par une fonction 3 cétonique serait un argument en faveur de l'unicité de l'enzyme et le voisinage (ou la confusion) des sites actifs.

Parallèlement si l'oxydation d'un stéroide libre 17β-hydroxylé est inhibée compétitivement par un glucuronide de stéroide 17 ou 3 cétonique cela rend vraisemblable l'unicité (ou le voisinage) des sites enzymatiques en cause.

C - Méthodes et résultats

a - stéroides inhibant l'oxydation de la testostérone.

(1) Méthodes - L'activité enzymatique est jugée sur l'augmentation de la densité optique à 340 mμ. Dans la cuvette en quartz de 3 ml sont ajoutés :

- 1 ml de tampon pyrophosphate pH : 8,9
- 0,1 ml de solution de NAD (5 μM)
- 0,02 ml d'une solution de testostérone de 7,2 mg dans 10 ml de dioxane (concentration finale : $1,66.10^{-5}$ M).

. 0,2 ml de dioxane contenant éventuellement l'effecteur à tester.

. eau distillée pour compléter à 2,9 ml (contenant éventuellement l'effecteur hydrosoluble à tester).

. 0,1 ml de solution d'enzyme non purifié.

(2) Résultats (voir tableau ci-contre)

b - stéroides inhibant l'oxydation du 3-glucuronide d'androstènediol

(1) Méthodes - La réaction est suivie comme en (a). Le milieu de réaction contient :

. 1 ml de tampon pyrophosphate pH : 8,9

. 0,1 ml de solution de NAD (5 µM)

. 0, 2 ml d'une solution de 3-glucuronide d'androstènediol dans de l'eau bidistillée (donnant une concentration finale de $3{,}33.10^{-5}$ M)

. eau bidistillée pour compléter à 2,9 ml (contenant l'effecteur hydrosoluble à tester)

. 0,1 ml de solution enzymatique

(2) Résultats (voir tableau ci-contre).

c - Le phénomène observé est-il réellement une inhibition ?

(1) But de l'expérience - Ainsi qu'il vient de l'être montré, l'oxydation de la testostérone (suivie sur la vitesse d'apparition du NADH semble être inhibée par la présence du glucuronide de testostérone.

Mais étant donné la double polarité de l'enzyme (3α ol et 17β ol) il est possible de concevoir un autre mécanisme :

a -

Concentration de testostérone	Effecteur	Concentration de l'effecteur	% d'inhibition
$1,66.10^{-5}$ M	androstènedione	$1,66.10^{-5}$ M	35
"	androstènedione	$1,66.10^{-4}$ M	62
"	glucuronide de DHA	$1,66.10^{-4}$ M	32
"	glucuronide de testostérone	$1,66.10^{-5}$ M	0
"	glucuronide de testostérone	$1,66.10^{-4}$ M	35
"	glucuronide de testostérone	$3,33.10^{-4}$ M	40
"	Diglucuronide d'androstènediol	5.10^{-5} M	0
"	Diglucuronide d'androstènediol	$8,3.10^{-5}$ M	0
"	Diglucuronide d'androstènediol	$2,8.10^{-4}$ M	0

b -

Concentration de 3 glucuronide d' androstènediol	Effecteur	Concentration de l'effecteur	% d'inhibition
$3,33.10^{-5}$ M	glucuronide de DHA	$1,66.10^{-4}$ M	43
"	glucuronide de testostérone	$1,66.10^{-4}$ M	37

en même temps que se produit la réaction

$$\text{testostérone} + NAD^+ \rightleftharpoons \text{androstènedione} + NADH + H^+$$

pourrait se produire la réaction

$$\text{glucuronide de testostérone} + NADH \longrightarrow \text{17-glucuronide d'androstènediol} + NAD^+$$

La vitesse d'apparition du NADH ne serait qu'en apparence diminuée, le cofacteur réduit servant dès son apparition à hydrolyser le glucuronide de testostérone.

Ce mécanisme semblait peu probable : les réductions n'ont pas lieu (ainsi que l'a montré Talalay) à pH : 8,9 et la cinétique initiale d'une réaction complexe ne se traduit pas par une droite comme celle obtenue dans notre expérience.

Cependant pour éliminer une telle éventualité nous avons voulu caractériser les stéroides obtenus à l'issue de l'incubation. S'il s'agissait d'une transhydrogénation nous devrions obtenir du glucuronide d'androstènediol.

(2) Méthode

(a) - le milieu d'incubation contenait :

. 1 ml de tampon pyrophosphate pH : 8,9

. 0,1 ml de solution de NAD (5 µM)

. 0,02 ml de dioxane contenant 14,4) de testostérone (concentration finale $1{,}66.10^{-5}$ M).

. eau distillée complétant à 2,8 ml et contenant 54 γ de glucuronide de testostérone (concentration finale $3,33.10^{-4}$ M)

. 0,2 ml de solution enzymatique

(b) - à la fin de la réaction les stéroides libres furent extraits par le dichlorométhane.

Les glucuroconjugués hydrolysés par du suc d'Helix Pomatia et également extraits par le dichlorométhane.

Les extraits furent chromatographiés sur plaques de silicagel dans le système éther - chloroforme, face à des témoins d'androstènediol, testostérone et androstènedione.

Toutes ces opérations furent effectuées selon les modalités précédemment décrites.

(c) - résultats

Les stéroides libres obtenus étaient la testostérone et l'androstènedione.

Le seul glucuroconjugué retrouvé fut le glucuronide de testostérone. Il n'a pas été trouvé de glucuronide d'androstènediol.

Ces résultats confirmaient que le phénomène observé était bien une inhibition et non une transhydrogénation.

d - Nature de l'inhibition

(a) - Méthodes - Afin d'établir s'il s'agissait d'une inhibition compétitive, la vitesse initiale de la réaction a été étudiée à diverses concentrations de substrat en l'absence puis en présence d'inhibiteur.

Le substrat choisi a été le 3-glucuronide d'androstènediol de préférence à la testostérone. En effet nous avons vu que la cinétique de ce dernier composé est complexe (inhibition par excès de substrat). L'inhibiteur a été le glucuronide de testostérone.

Le milieu de réaction était identique à celui décrit précédemment (inhibition de l'oxydation du 3-glucuronide d'androstènediol).

(b) résultats (voir tableau ci-contre)

Selon la représentation de Lineveawer et Burke (1934) les deux droites se coupant sur la ligne des ordonnées montrent qu'il s'agit d'une inhibition compétitive.

Selon une autre représentation de Lineveawer et Burke $\frac{S}{v} = f(S)$ le parallélisme des deux droites objective également le caractère compétitif de l'inhibition.

On peut en déduire la valeur du K_i pour le glucuronide de testostérone ($K_i \# 8.10^{-5}$ M) (Fig. 9 et 10).

D - Discussion

Si nous résumons les résultats obtenus en tenant compte des fonctions portées sur les carbones 3 et 17 par les substrats et par les effecteurs (tableau ci-contre), nous voyons qu'une fonction cétonique sur le carbone 17 ou sur le carbone 3 est nécessaire afin que le stéroide ait une action inhibitrice sur l'oxydation d'un composé 17β-hydroxylé.

Concentration de substrat	vitesse initiale en l'absence d'inhibiteur	vitesse initiale en présence de glucuronide de testostérone ($1,66.10^{-4}$ M)
$1,66.10^{-5}$ M	12 11	5
$2,5 .10^{-5}$ M	16	7 8
$3,33.10^{-5}$ M	16	9
$4,16.10^{-5}$ M	19	10
5.10^{-5} M		12
$8,33.10^{-5}$ M		14

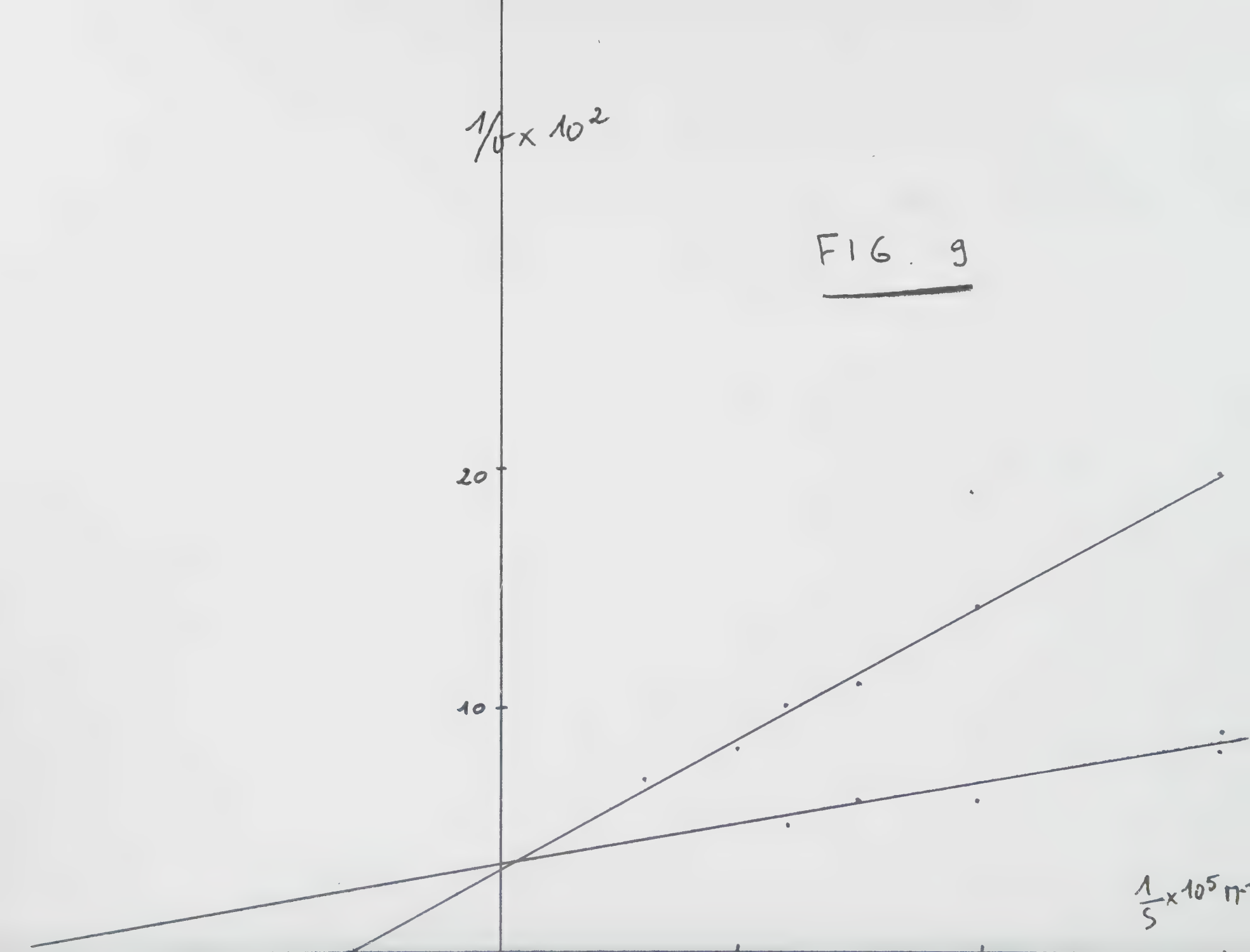
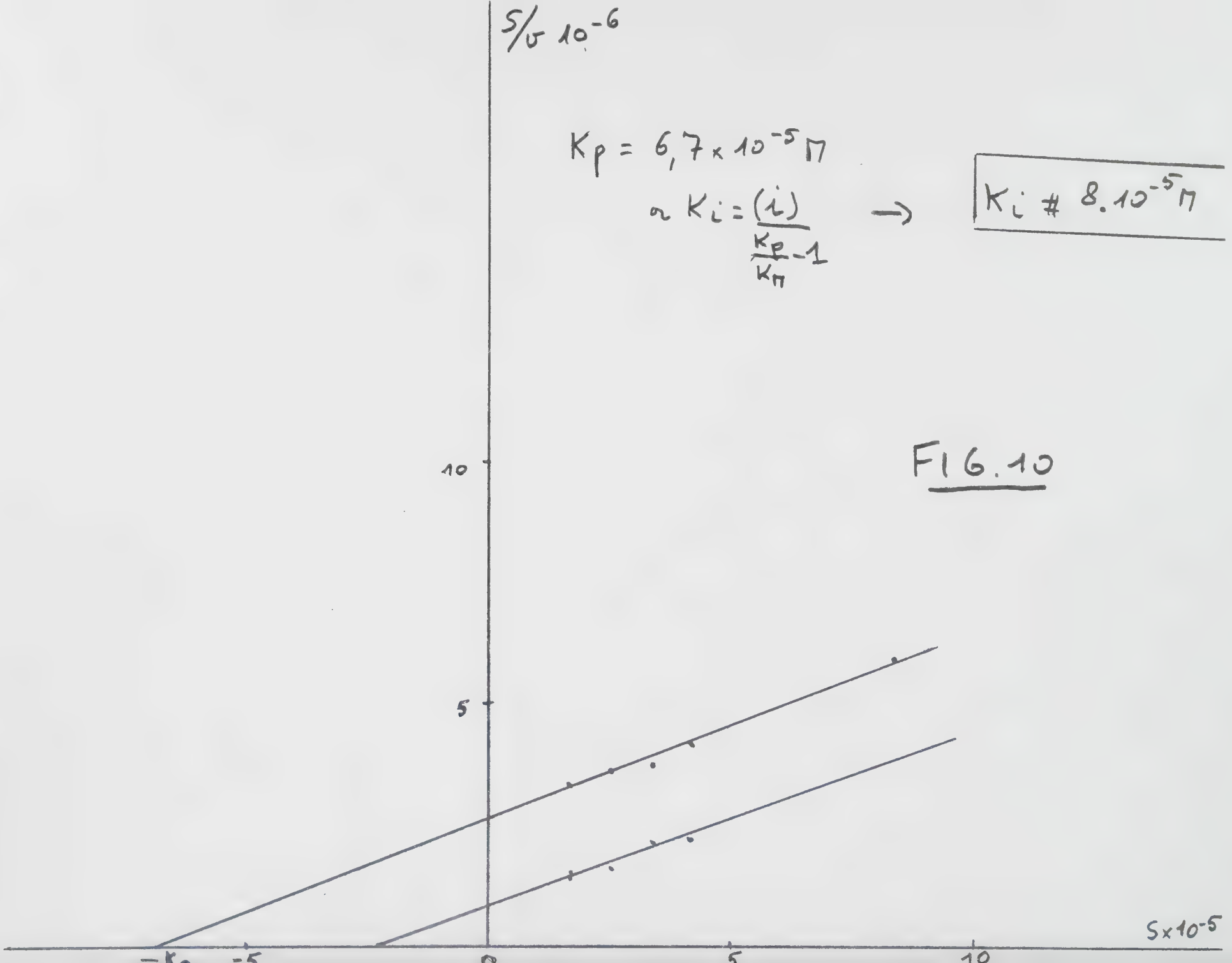


FIG. 9



$K_p = 6,7 \times 10^{-5}\ \Omega$

$\Rightarrow K_i = \dfrac{(i)}{\frac{K_p}{K_\Pi} - 1}$ $\longrightarrow$ $\boxed{K_i \# 8.10^{-5}\ \Omega}$

FIG. 10

Nom du substrat		Nom de l'effecteur		Inhibition
Testostérone	3 C=O 17 C=O	Androstènedione	3 C=O 17 C=O	(+)
Testostérone	3 C=O 17 C=O	Diglucuronide d'androstènediol		0
Testostérone	3 C=O 17 C=O	Glucuronide de DHA	17 C=O	(+)
Testostérone	3 C=O 17 C=O	Glucuronide de testostérone	3 C=O	(+)
3 glucuronide d'androstènediol	17 OH	Glucuronide de DHA	17 C=O	(+)
3 glucuronide d'androstènediol	17 OH	Glucuronide de testostérone	3 C=O	(+)

Par ailleurs l'oxydation d'un stéroide libre comme la testostérone est inhibée par des stéroides cétoniques glucuroconjugués.

Ces constatations vérifient les hypothèses émises précédemment (voir A - But de l'expérience) et nous semblent constituer un argument pour le voisinage (ou même l'unicité) des sites d'oxydo-réduction des fonctions 3β et 17β alcooliques des stéroides libres et glucuro-conjugués.

V. - EXPERIENCES FAITES SUR LA 17β - HYDROXYSTEROIDE DESHYDROGENASE DES GLOBULES ROUGES HUMAINS

1. But de l'expérience

a) Vérifier grâce à un enzyme humain le résultat déjà obtenu à l'aide d'un enzyme bactérien. Donc obtenir la transformation directe 3 sulfate (ou glucuronide) d'androstènediol ——→ sulfate (ou glucuronide) de déhydroépiandrostérone.

b) Afin de nous placer dans les conditions les plus favorables à l'accès des stéroides à l'enzyme nous avons travaillé sur des globules rouges hémolysés. L'élimination du plasma évite la fixation des stéroides sur les protéines; l'hémolyse permet de ne pas tenir compte des problèmes de traversée par les substrats des membranes erythrocytaires.

2. Méthodes et résultats

a) Préparation du sang hémolysé : le sang a été prélevé sur héparine. Les donneuses étaient des femmes jeunes, hospitalisées pour obésité. Le sang est centrifugé dans une centrifugeuse réfrigérée. Le plasma est

rejetté. Le culot globulaire est lavé à deux reprises par un volume double de sérum physiologique.

10 ml de globules rouges sont placés dans chaque erlen prévu pour l'incubation. Les erlens sont conservés une nuit à - 20°, ce qui entraîne l'hémolyse; puis dégelés en chambre froide à + 4°.

b) Incubations :

Dans chaque erlen on ajoute :

a. 10 ml de sérum physiologique

b. 30 µM de NADP dans 0,6 ml d'eau bidistillée

c. soit 1 ml d'eau bidistillée contenant 300 γ de 3 glucuronide d'androstènediol (2 incubations)

soit 0,5 ml d'eau bidistillée contenant 250 γ de 3 sulfate d'androstènediol (2 incubations)

d. 1 ml d'eau bidistillée contenant 11 mg de pénicilline G et 22 mg de streptomycine.

L'incubation est faite à 37°, dans un incubateur à agitation continue, en présence d'air. La durée en est de 24 heures.

c) Extraction des stéroides :

a. L'incubat de chaque erlen est transvasé dans un tube à centrifugation. On ajoute 45 cc d'alcool absolu (ce qui donne une solution d'alcool à 75 % environ). On laisse reposer 3 heures.

Centrifugation 15 minutes à 5.000 tours/minute. Le surnageant est conservé.

Le précipité est resuspendu dans 30 cc d'alcool à 75 %.

Centrifugation identique à la précédente. Le surnageant est joint au premier.

b. La solution est encore fortement colorée par l'hémoglobine. On laisse reposer pendant la nuit.

Le lendemain toute l'hémoglobine a précipité. On filtre.

c. Extraction volume à volume par l'hexane (1 heure).

d. Evaporation de l'alcool.

e. Extraction au dichlorométhane à volume égal une fois, à moitié volume deux fois (1 h 30).

Le dichlorométhane est lavé à l'eau, séché sur SO_4Na_2 et concentré par évaporation.

f. Solvolyse pour les sulfates.

On hydrolyse par le suc d'Helix Pomatia pour les glucuronides.

g. Les extraits obtenus sont encore fortement colorés en jaune. Pour obtenir un extrait pouvant être déposé sur un chromatogramme, on fait une chromatographie sur colonne de silice.

d) Identification des stéroides :

a. Les extraits (contenant d'une part les stéroides libres, d'autre part les sulfates solvolysés) de la première incubation de 3 sulfate d'androstènediol sont chromatographiés sur papier dans le système ligroïne - propanediol en face de témoins de déhydroépiandrostérone et d'androstènediol. Le chromatogramme est coupé en 2 : la zone corres-

pondant à l'androstènediol (près de la ligne de dépôt) est révélée au $SbCl_3$, la zone correspondant à la déhydroépiandrostérone au réactif de Zimmermann. Aucun stéroide libre n'est retrouvé.

Dans la bande du chromatogramme correspondant aux sulfoconjugués solvolysés on trouve une tache migrant au niveau de l'androstènediol et une autre migrant comme la déhydroépiandrostérone et révélée par la coloration de Zimmermann.

b. Les extraits provenant de la deuxième incubation de 3 sulfate d'androstènediol sont chromatographiés sur plaque de silicagel dans le système benzène 3 - acétate d'éthyle 2.

La révélation au réactif anisique montre l'absence de tout stéroide libre et la présence de taches ayant migré comme l'androstènediol et la déhydroépiandrostérone dans la colonne des sulfates solvolysés.

c. Les deux incubations de 3 glucuronide d'androstènediol ont été traitées de façon identique et ont donné les mêmes résultats.

Au total : après incubation de 3 sulfate (ou de 3 glucuronide) d'androstènediol on retrouve un sulfate (ou un glucuronide) de stéroide qui après hydrolyse migre comme la déhydroépiandrostérone dans deux systèmes différents de chromatographie et est colorable par le réactif de Zimmermann.

Il est probable que les réactions observées ont été :

(1) 3 sulfate d'androstènediol + $NADP^+$ ------> sulfate de déhydroépiandrostérone + NADPH + H^+

(2) 3 glucuronide d'androstènediol + $NADP^+$ ------> glucuronide de déhydroépiandrostérone + NADPH + H^+

Ces réactions n'ont pas été totales : on retrouve du glucuronide (ou du sulfate) d'androstènediol.

Ces réactions ne sont pas accompagnées d'hydrolyse des stéroides conjugués (on ne retrouve pas de stéroides libres).

3. Discussion

A - Sulfate de déhydroépiandrostérone et 3 sulfate d'androstènediol

Jusqu'à une époque relativement récente les sulfates de stéroides étaient considérés comme une forme de "détoxication" hépatique des hormones.

En 1960, Baulieu (13, 15) montra l'existence d'une secrétion surrénalienne de sulfate de déhydroépiandrostérone chez deux malades porteurs de tumeurs cortico-surrénales.

La secrétion de ce composé par les surrénales normales fut ensuite établie (16, 123).

Il a été également montré à l'aide de stéroides doublement marqués qu'il existait une transformation "directe" (sans hydrolyse et reconjugaison) du sulfate de déhydroépiandrostérone en 3 sulfate d'androstènediol et inversement (18, 20, 30).

Après injection de sulfate de déhydroépiandrostérone marqué, le rendement en 3 sulfate d'androstènediol était meilleur qu'après injection de déhydroépiandrostérone.

La même constatation était faite pour la réaction inverse.

Ces constatations impliquaient :

a. la possibilité pour la 17β-hydroxystéroide deshydrogénase d'admettre un sulfate pour substrat.

b. peut-être une plus grande affinité de l'enzyme pour les stéroides sulfoconjugués que pour les stéroides libres (le système étant complexe d'autres facteurs pourraient intervenir : action des sulfatases, pénétration cellulaire des stéroides, etc...).

Nous avons pu vérifier le premier de ces points à l'aide de 17β-hydroxystéroide oxydo-réductases de Pseudomonas Testosteroni et de globules rouges humains.

Par contre, avec l'enzyme ~~érythrocytaire~~ bactérien, le deuxième point s'est avéré inexact. Cependant, avant de rejeter cette hypothèse l'expérience serait à refaire avec l'enzyme de foie humain.

L'importance physiologique de ce métabolisme des sulfoconjugués n'est pas encore entièrement connue.

Au cours de la grossesse il est démontré (17, 24, 29, 97) que la formation de l'oestriol fait intervenir un métabolisme "direct" des sulfoconjugués.

La surrénale foetale sécrète du sulfate de déhydroépiandrostérone, qui est transformé dans le foie en 3 sulfate d'androstènetriol (inter-

vention d'une 17β-hydroxystéroide deshydrogénase hépatique et d'une hydroxylase).

A partir de ce dernier composé le placenta libère de l'androstènetriol qui est aromatisé dans les microsomes placentaires en oestriol.

En dehors de la grossesse il est possible que le métabolisme "direct" des sulfoconjugués intervienne dans la biosynthèse de la testostérone à partir du sulfate de déhydroépiandrostérone, la voie possible étant :

sulfate de déhydroépiandrostérone ⟶ 3 sulfate d'androstènediol ⟶ androstènediol ⟶ testostérone.

Ces chaînons métaboliques sont possibles (18, 20, 19) mais on n'a pas confirmé leur existence dans les conditions physiologiques et a fortiori on n'a pas chiffré l'importance de cette voie.

B - Glucuronide de déhydroépiandrostérone et 3 glucuronide d'androstènediol

Robel et coll. (20, 94) ont montré qu'il existait un métabolisme direct du glucuronide de déhydroépiandrostérone. Ce métabolisme faisait intervenir entre autres la 17β-hydroxystéroide deshydrogénase (passage au 3 glucuronide d'androstènediol et 3 glucuronide d'androstanediol).

Knapstein et coll. après injection de glucuronide de déhydroépiandrostérone doublement marqué (68, 69) ont obtenu du 3 glucuronide d'androstènediol doublement marqué ainsi que d'autres composés dont la

synthèse nécessite l'intervention des 17β-hydroxystéroide oxydo-réductases.

L'importance quantitative de cette voie métabolique, sa signification physiologique restent encore inconnues.

R E S U M E E T C O N C L U S I O N S

1° - La transformation *in vitro* du 3 sulfate d'androstènediol en sulfate de déhydroépiandrostérone et du 3 glucuronide d'androstènediol en glucuronide de déhydroépiandrostérone a été obtenue en présence de 17β-hydroxystéroide deshydrogénase de *Pseudomonas Testosteroni* (E.C. : 1.1.1.51) et de globules rouges humains.

La possibilité de cette transformation avait été fortement suggérée par les résultats des expériences *in vivo* démontrant un métabolisme "direct" de ces composés.

2° - Une étude cinétique de la 17β-hydroxystéroide deshydrogénase de *Pseudomonas Testosteroni* a été entreprise montrant que l'affinité de l'enzyme pour les androstène-stéroides conjugués (glucuronide d'androstènediol $K_M \# 2,5.10^{-5}$ M, sulfate d'androstènediol $K_M \# 2.10^{-5}$ M) semble plus faible que pour les stéroides libres ($K_M \# 10^{-6}$ M).

Contrairement aux stéroides libres, un excès de stéroide conjugué n'inhibe pas l'activité enzymatique.

Il a été établi que l'oxydation d'une fonction 17β hydroxylée d'un stéroide libre ou d'un stéroide conjugué était inhibée compétitivement

par les stéroides libres ou conjugués porteurs d'une fonction cétonique sur les carbones 17 ou 3. Ces faits suggèrent que les oxydo-réductions des groupements portés par les carbones 3 et 17 se font sur des sites voisins (peut-être même sur un site unique).

De même l'activité catalytique envers les glucuronides de stéroides semble se faire sur des sites voisins (ou sur le même site) que celle s'exerçant sur les stéroides libres.

Ces faits montrent la difficulté d'un essai de compréhension des transformations in vivo. L'oxydo-réduction d'un stéroide semblant non seulement dépendre de son pouvoir d'accéder à l'enzyme, de la concentration locale de cofacteurs, mais également de la concentration du stéroide lui-même, de la concentration d'autres stéroides libres et conjugués.

REFERENCES

1. ABE T., HAGERMAN D.D. and VILLEE C.A. : Estrogen dependent pyridine nucleotide transhydrogenase of human myometrium.
J. Biol. Chem., 239, 414, 1964.

2. ADAMS J.A., JARABAK J. and TALALAY P. : The steroid specificity of the 17β-hydroxysteroid dehydrogenase of human placenta.
J. Biol. Chem., 237, 3069, 1962.

3. AOSHIMA Y. and KOCHAKIAN C.D. : Activity, intracellular distribution and some properties of 17β-hydroxy-C_{19}-steroid dehydrogenases in liver and kidney.
Endocrinology, 72, 106, 1963.

4. AXELROD L.R., MILLER L.L. and HERLING F. : The metabolism of testosterone in the isolated perfused dog liver.
J. Biol. Chem., 219, 455, 1956.

5. AXELROD L.R. and WERTHESSEN N.T. : The conversion of oestradiol 17β to oestrone in cow blood.
Arch. Biochem. Biophys., 83, 567, 1959.

6. AXELROD L.R. and WERTHESSEN N.T. : The metabolism of estrone-16-C^{14} in bovine blood.
Arch. Biochem., 86, 53, 1960.

7. AXELROD L.R. and WERTHESSEN N.T. : Blood as a site for the conversion of the steroid hormones.
Endocrinology, 68, 180, 1961.

8. BAILLIE A.H., CALMAN K.C., and MILNE J.A. : Histochemical distribution of hydroxysteroid dehydrogenases in human skin.
Brit. J. Dermatol., 77, 610, 1965.

9. BAILLIE A.H., FERGUSON M.M. and HART D. McK. : Developments in steroid histochemistry.
Academic Press, 1966.

10. BAILLIE A.H., FERGUSON M.M. and HART D. McK. : Evidence of steroid metabolism and possible biosynthesis in the human genital ridge mesenchyme.
J. Clin. Endocr., 26, 738, 1966.

11. BAILLIE A.H. and MACK W.S. : Hydroxysteroid dehydrogenases in normal and abnormal human testes.
J. Endocr., 35, 239, 1966.

12. BAILLIE A.H., FERGUSON M.M. and HART D. McK. : Ontogenetic and phylogenetic distribution of hydroxysteroid dehydrogenases in the vertebrate kidney.
J. Endocr., 36, 29, 1966.

13. BAULIEU E.-E. : Ester-sulfates de stéroides hormonaux. Isolement de l'ester-sulfate de 5-androstène-3β-ol-17-one (déhydroépiandrostérone) dans une tumeur cortico-surrénalienne. Absence de stéroide libre.
Compt. Rend., 251, 1421, 1960.

14. BAULIEU E.-E. and EMILIOZZI R. : Esters-sulfates de stéroides. Propriétés physico-chimiques.
Bull. Soc. Chim. Biol., 44, 823, 1962.

15. BAULIEU E.-E. : Studies of conjugated 17-ketosteroids in a case of adrenal tumor.
J. Clin. Endocr., 22, 501, 1962.

16. BAULIEU E.-E. : Discussion
in Rec. Progr. Hormone Res., 19, 306, 1963 (G. Pincus, ed).

17. BAULIEU E.-E. et DRAY F. : Conversion of H^3-dehydroepiandrosterone (3β-hydroxy-Δ_5-androsten-17-one) sulfate to H^3-estrogens in normal pregnant women.
J. Clin. Endocr., 23, 1928, 1963.

18. BAULIEU E.-E., CORPECHOT C. and EMILIOZZI R. : H^3-androstene-3β,17β-diol-S^{35}-sulfate to H^3-dehydroisoandrosterone S^{35}-sulfate "in vivo": an example of the direct metabolism of a steroid conjugate.
Steroids, 2, 429, 1963.

19. BAULIEU E.-E. and ROBEL P. : Androst-5-ene-3β,17β-diol-17α-^{3}H to testosterone-17α-^{3}H and 5α and 5β-androstane-3α,17β-diol-17α-^{3}H in vivo.
Steroids, 2, 111, 1963.

20. BAULIEU E.-E., CORPECHOT C., DRAY F., EMILIOZZI R., LEBEAU M.C., MAUVAIS-JARVIS P. and ROBEL P. : An adrenal-secreted "androgen" : dehydroisoandrosterone sulfate. Its metabolism and a tentative generalization on the metabolism of other steroid conjugates in man.
Rec. Progr. Hormone Res., 21, 411, 1965 (G. Pincus, ed).

21. BAXTER A.D., BAILLIE A.H. and al. : The histochemical localisation of hydroxysteroid dehydrogenase activity in the livers of various species.
Histochemie, 7, n°3, 218, 1966.

22. BISCHOFF F., KATHERMAN R.E. and YEE Y.S. : Activation of estrone by mammalian red cells.
Amer. J. Physiol., 164, 774, 1951.

23. BISCHOFF F., KATHERMAN R.E., FAVATI V. and GRAY C.L. : Metabolic effect of red blood cells on estrone.
Amer. J. Physiol., 171, 100, 1952.

24. BOLTE E., MANCUSO S., ERIKSSON G., WIQVIST N. and DICZFALUSY E. : Studies on the aromatisation of neutral steroids in pregnant women. II. Over-all aromatisation of dehydroepiandrosterone sulphate circulating in the foetal and maternal compartments.
Acta Endocrinol., 45, 576, 1964.

25. BOTTE V., MATERAZZI G. and CHIEFFI G. : Histochemical distribution of 3β-hydroxysteroid dehydrogenase and 17α and 17β-hydroxysteroid dehydrogenases in the placenta and foetal membranes of the rat.
J. Endocr. 34, 179, 1966.

26. BREUER H., KNUPPEN R. and HAUPT M. : Metabolism of oestrone and oestradiol 17β in human liver in vitro.
Nature, 212, 5057, 76, 1966.

27. BREUER H. : Handbuch der physiologish and pathologish-chemischen analyse
10th ed, G A, 423.

28. CALMAN K.C., BAILLIE A.H., FERGUSON M.M. and HART D. McK. : Hydroxysteroid dehydrogenase in the human adrenal cortex.
J. Endocri. 34, 439, 1966.

29. CORPECHOT C. et BAULIEU E.-E. : Formation de sulfate d'androsta-5-ène-3β,16α,17β-triol ^{35}S-^{3}H après administration de sulfate de 3β-hydroxy-androsta-5-ène-17-one (sulfate de déhydroépiandrostérone). Signification de ce métabolisme "ultérieur" d'un stéroide conjugué pour la biosynthèse de l'oestriol dans le placenta.
Compt. Rend., 258, 3589, 1964.

30. CREPY O. and JAYLE M.F. : Métabolisme in vitro des stéroides conjugués. Réduction des sulfates de androsta-5-ène-3β yl-17-one, 5α-androstane 3β yl-17-one, 5β-androstane-3α yl-17-one par des coupes de foie de lapin.
Compt. Rend., 258, 3923, 1964.

31. CRIST R.D. and WARREN J.C. : Transhydrogenation in the human placenta.
Acta Endocrinol., 53, 205, 1966.

32. DELIN S., SQUIRE P.G. and PORATH J. : Purification of steroid-induced enzymes from Pseudomonas Testosteroni.
Biochim. Biophys. Acta, 89, 398, 1964.

33. DOWBEN R.M. and RABINOWITZ J.L. : Oxidation in vitro of radioactive oestradiol by preparations of human tissue.
Nature, 178, 696, 1956.

34. EL ATTAR T., MOSEBACH K.O. and DIRSCHERL W. : The initial metabolism of 4-^{14}C-testosterone in the rat. II. In liver, blood, plasma, seminal vesicles and ventral prostate.
Acta Endocrinol., 45, 437, 1964.

35. EMILIOZZI R. : Glucuronosides d'hydroxystéroides dans la série de l'androstane.
Compt. Rend., 258, 3875, 1964.

36. ENDAHL G.L., KOCHAKIAN C.D. and HAMM D. : Separation of a TPN-specific from a DPN specific 17β-hydroxy (testosterone) dehydrogenase of guinea pig liver.
J. Biol. Chem., 235, 2792, 1960.

37. ENDAHL G.L. and KOCHAKIAN C.D. : Partial purification and further characterization of the triphospho pyridine nucleotide specific C_{19}-17 -hydroxysteroid dehydrogenase of guinea pig liver.
Biochim. Biophys. Acta, 64, 245, 1962.

38. ENGEL L.L. and SCOTT J.F. : Effects of steroid hormones upon diphosphopyridine nucleotide-mediated enzymatic reactions.
Rec. Progr. Hormone Res., 16, 79, 1960 (G. Pincus, ed).

39. ENGEL L.L., JOSHI S.G. and DUNCAN E.L. : Studies on the soluble TPN-specific 17β-hydroxysteroid (testosterone) dehydrogenase from guinea pig liver.
Fed. Proc., 22, 468, 1963.

40. FISHMAN J., BRADLOW H.L. and GALLAGHER T.F. : Oxidative metabolism of oestradiol.
J. Biol. Chem., 235, 3104, 1960.

41. GLASS R., LORIN G.L., SPENCER R.J. and VILLEE C.A. : The estrogenic properties in vitro of diethylstilbestrol and substances related to estradiol.
Endocrinology, 68, 327, 1961.

42. GOMEZ E.C. and HSIA S.L. : Studies in cutaneous metabolism of testosterone-4-^{14}C.
Fed. Proc., 25, 282, 1966.

43. GORDON E.E. and VILLEE C.A. : Spectrophotometric studies of the stimulation of human placental preparations by estradiol.
J. Biol. Chem., 216, 215, 1955.

44. GRAY C.L. and BISCHOFF F. : Conversion of oestrone to oestradiol by mammalian red cells.
Amer. J. Physiol., 180, 279, 1955.

45. HAGERMAN D.D. and VILLEE C.A. : Effects of estradiol in the metabolism of human endometrium in vitro.
J. Biol. Chem., 203, 425, 1953.

46. HAGERMAN D.D. and VILLEE C.A. : Estrogen sensitive isocitric dehydrogenase.
J. Biol. Chem., 229, 589, 1957.

47. HAGERMAN D.D. and VILLEE C.A. : Separation of human placental estrogen-sensitive transhydrogenase from estradiol 17β dehydrogenase.
J. Biol. Chem., 234, 2031, 1959.

48. HAGERMAN D.D., VILLEE C.A. and WELLINGTON F.M. : Separation of human placental estrogen-sensitive transhydrogenase from estradiol 17β dehydrogenase.
Fed. Proc., 18, 240, 1959.

49. HAGERMAN D.D. and VILLEE C.A. : Kinetics of Nicotinamide Nucleotide transhydrogenation by human placenta.
Biochem. J., 95, 150, 1965.

50. HAGERMAN D.D. and VILLEE C.A. : A mechanism of action for estrogenic steroid hormones.
in "Mechanism of action of steroid hormones", 1961, p. 169
Pergamon Press.

51. HAGERMAN D.D. : Monomer-trimer polymerization of human placenta estradiol dehydrogenase.
Fed. Proc., 25, 281, 1966 Abstract n° 518.

52. HARDING B.W. and SAMUELS L.T. : The uptake and subcellular distribution of C^{14}-labeled steroid in rat ventral prostate following in vitro administration of testosterone-4-C^{14}.
Endocrinology, 70, 109, 1962.

53. HATHAWAY R.R. and WEST C.D. : Conversion of 17β-estradiol to estrone by spermatozoa of dogs and men.
Endocrinology, 75, 616, 1964.

54. HAY M.F. and DEANE H.W. : Attempts to demonstrate 3 β and 17 β-hydroxysteroid dehydrogenases histochemically in the testes of the stallion, boar, ewe and bull.
J. Reprod. Fertil., 12, 551, 1966.

55. HOLLANDER V.P., NOLAN H. and HOLLANDER N. : The structural specificity of the estrogen-sensitive enzyme system in placental homogenates.
J. Biol. Chem., 233, 580, 1958.

56. HOLLANDER V.P., HOLLANDER N. and BROWN J.D. : The activity of synthetic isoestrones in pyridine nucleotide transhydrogenation.
Endocrinology, 64, 621, 1959.

57. HOLLANDER V.P., HOLLANDER N. and BROWN J.D. : Studies on the estrogen-sensitive enzyme system from placenta.
J. Biol. Chem., 234, 1678, 1959.

58. HOLLANDER V.P., HOLLANDER N. and BROWN J.D. : Inhibition of steroid mediated pyridine nucleotide transhydrogenase and 17β-hydroxy-steroid dehydrogenase by 2'adenylic acid.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 101, 475, 1959.

59. HURLOCK B. and TALALAY P. : Principles of the enzymatic measurement of steroids.
J. Biol. Chem., 227, 37, 1957.

60. HURLOCK B. and TALALAY P. : Enzymatic estimation of steroids in human urine.
Endocrinology, 62, 201, 1958.

61. INANO H. and TAMAOE B. : Bioconversion of steroids in immature rat testes in vitro.
Endocrinology, 79, 579, 1966.

62. JARABAK J., ADAMS J.A., WILLIAMS-ASHMAN H.G. and TALALAY P. : Purification of a 17β-hydroxysteroid dehydrogenase of human placenta and studies on its transhydrogenase function.
J. Biol. Chem., 237, 345, 1962.

63. JARABAK J., SEEDS A.E. and TALALAY P. : Reversible cold inactivation of a 17β-hydroxy dehydrogenase of human placenta, protective effect of glycerol.
Biochemistry, 5, 1269, 1966.

64. JENSEN E.V. and JACOBSON H.I. : Basic guides to the mechanism of estrogen action.
Rec. Progr. Hormone Res., 18, 387, 1962 (G. Pincus, ed).

65. KARAVOLAS H.J. and ENGEL L.L. : Human placental 17β-estradiol dehydrogenase. III. The separation of a 17β-estradiol-dependent transhydrogenase.
J. Biol. Chem., 241, 3454, 1966.

66. KELLOGG D.A. and GLENNER G.G. : Histochemical localisation of human term placental 17β-oestradiol dehydrogenase. Implication for the transhydrogenase reaction.
Nature, 187, 763, 1960.

67. KINSON A.G. and KOCHAKIAN C.D. : DPN and TPN-17β-hydroxy-C_{19}-steroid dehydrogenase activities in skeletal muscles.
Endocrinology, 74, 233, 1964.

68. KNAPSTEIN P., WENDELBERGER F. and OERTEL G.W. : Direct metabolism of 7α-^{3}H DHEA-3-^{14}C glucuronide.
Experientia, 22, 785, 1966.

69. KNAPSTEIN P., RIND T.W., WENDELBERGER F. and OERTEL G.W. : Plasmahalbwertszeit, exkretion und direkter metabolismus von (7 -^{3}H) androstenolon-(^{14}C) glucuronid beim menschen.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 348, 93, 1967.

70. KOCHAKIAN C.D., CARROLL B.R. and UHRI B. : Comparisons of the oxidation of C_{19}-hydroxysteroids by guinea pig liver homogenates.
J. Biol. Chem., 224, 811, 1957.

71. KOCHAKIAN C.D., CARROLL B.R. and UHRI B. : Metabolism of C_{19}-steroids by homogenates of kidney, heart, testes and prostate.
Amer. J. Physiol., 189, 83, 1957.

72. KOCHAKIAN C.D., RAUT V. and NALL D.M. : Metabolism of testosterone by guinea pig liver and kidney homogenates.
Amer. J. Physiol., 189, 78, 1957.

73. KOCHAKIAN C.D. and KINSON G. : Use of coenzymes I and II in interconversion of testosterone and androstenedione.
Amer. J. Physiol., 200, 348, 1961.

74. KOIDE S.S. and MITSUDO S.M. : Histochemical study of 3β and 17β-hydroxysteroid dehydrogenases in human term placenta.
Endocrinology, 76, 403, 1965.

75. LAIDLER K.J. and KRUPKA R.M. : Enzyme mechanism in relation to the mode of action of steroid hormones.
in "Mechanism of action of steroid hormones" p. 235
Pergamon Press.

76. LANGER L.J. and ENGEL L.L. : Human placental estradiol-17β dehydrogenase. I. Concentration, characterization and assay.
J. Biol. Chem., 233, 583, 1958.

77. LANGER L.J., ALEXANDER J.A. and ENGEL L.L. : Human placental estradiol-17β dehydrogenase. II. Kinetics and substrate specificities.
J. Biol. Chem., 234, 2609, 1959.

78. LEVY L.K. : Incubation of oestrone in human blood mixtures.
Arch. Biochem. Biophys., 50, 207, 1954.

79. LEVY H., SAITO T., TAKEYAMA S., MERRILL A.P. and SCHEPIS J.P. : The conversion of androst-4-en-3,17-dione into testolactone and other substances by incubation in bovine blood.
Biochim. Biophys. Acta, 71, 749, 1963.

80. MARCUS P.I. and TALALAY P. : On the molecular specificity of steroid-enzyme combinations. The kinetics of β-hydroxysteroid dehydrogenase.
Proc. Roy. Soc., B.144, 116, 1955.

81. MARCUS P.I. and TALALAY P. : Induction and purification of α and β-hydroxysteroid dehydrogenase.
J. Biol. Chem., 218, 661, 1956.

82. Mc GUIRE J. and PESCH L.A. : Control of glucose oxidation in anterior pituitary by hormonally sensitive pyridine nucleotide transhydrogenase.
Proc. Natl. Acad. Sci., US, 48, 2157, 1962.

83. MAHESH V.B. and ULRICH F. : Distribution of enzyme systems responsible for steroid metabolism in different tissues and subcellular fractions.
Nature, 184, 1147, 1959.

84. MEELING A.I. and LOKE K.H. : Metabolism of androstenedione by porcine adrenal homogenates.
Steroids, 8, 765, 1966.

85. MIGEON C.J., LESCURE O.L. and SIDBURY J.B. Jr. : In vitro studies with 16-C^{14} estrone : conversion to estradiol by red blood cells of men.
Acta Endocrinol., (suppl.), 51, 731, 1960.

86. MIGEON C.J., LESCURE O.L., ZINKHAM W.H. and SIDBURY J.B. Jr. : In vitro interconversion of 16-C^{14} estrone and 16-C^{14} estradiol 17β by erythrocytes from normal subjects and from subjects with a deficiency of red cell glucose-6-phosphate dehydrogenase activity.
J. Clin. Invest., 41, 2025, 1962.

87. PAYNE A.M. and MASON M. : Conversion of dehydroepiandrosterone sulfate to androst-5-enediol-3-sulfate by soluble extracts of rat testis.
Steroids, 6, 323, 1965.

88. PEARLMAN W.H. and PEARLMAN M.R. : The metabolism in vivo of Δ_4-androstene-3,17-dione-7-H^3; its localization in the ventral prostate and other tissues of the rat.
J. Biol. Chem., 236, 1321, 1961.

89. PEARSON B. and GROSE F. : Histochemical demonstration of 17β-hydroxysteroid dehydrogenase by use of a tetrazolium salt.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 100, 636, 1959.

90. PESCH L.A. : Isolation and partial characterization of hormonally sensitive mitochondrial NAD(P) transhydrogenase of liver.
Biochim. Biophys. Acta, 81, 229, 1964.

91. PORTIUS H.J. and REPKE K. : Uber stereospezifität und activität der oestradiol-dehydrogenasen in der erythrocyten von mensch und tier.
Arch. Exp. Path. Pharmak., 239, 184, 1960.

92. PORTIUS H.J. and REPKE K. : Eine oestradiol-17β dehydrogenase in den erythrocyten der ratte.
Arch. Exp. Path. Pharmak., 239, 144, 1960.

93. PURDY R.H., HALLA M. and LITTLE B. : 20α-hydroxysteroid dehydrogenase activity on function of human placental 17β-hydroxysteroid dehydrogenase.
Biochim. Biophys. Acta, 89, 557, 1964.

94. ROBEL P., EMILIOZZI R. and BAULIEU E.E. : The metabolism of dehydroisoandrosterone glucuronide. Physiological or chemical transconjugation to dehydroisoandrosterone sulfate.
J. Clin. Endocr., à paraître.

95. RONGONE E.L. : In vitro metabolism of testosterone by human male mammary skin.
Fed. Proc., 25, 282, 1966.

96. RYAN K.J. and ENGEL L.L. : The interconversion of oestrone and oestradiol by human tissue slices.
Endocrinology, 52, 287, 1953.

97. SIITERI P.K. and MAC DONALD P.C. : The utilisation of circulating dehydroisoandrosterone sulfate for estrogen synthesis during human pregnancy.
Steroids, 2, 713, 1963.

98. SQUIRE P.G., DELIN S. and PORATH J. : Physical and chemical characterization of hydroxysteroid dehydrogenases from Pseudomonas Testosteroni.
Biochim. Biophys. Acta, 89, 409, 1964.

99. STYLIANOU M., FORCHIELLI E., TUMMILLO M. and DORFMAN R.I. : Metabolism in vitro of (4-^{14}C) testosterone by human liver homogenate.
J. Biol. Chem., 236, 692, 1961.

100. SWEAT M.L., SAMUELS L.T. and LUMRY R. : Preparation and characterization of the enzyme which converts testosterone to androstenedione.
J. Biol. Chem., 185, 75, 1950.

101. TALALAY P. and DOBSON M.M. : Purification and properties of a Δ^5 hydroxysteroid dehydrogenase.
J. Biol. Chem., 205, 823, 1953.

102. TALALAY P., LOEWUS F.A. and VENNESLAND B. : The enzymatic transfer of hydrogen. IV. The reaction catalyzed by a 3 hydroxysteroid dehydrogenase.
J. Biol. Chem., 212, 801, 1955.

103. TALALAY P. and MARCUS P.I. : Specificity, kinetics and inhibition of 4 and 3 hydroxysteroid dehydrogenase.
J. Biol. Chem., 218, 675, 1956.

104. TALALAY P., HURLOCK B. and WILLIAMS-ASHMAN H.G. : On a coenzymatic function of estradiol-17β.
Proc. Natl. Acad. Sci. US, 44, 862, 1958.

105. TALALAY P. and WILLIAMS-ASHMAN H.G. : Activation of hydrogen transfer between pyridine nucleotides by steroid hormones.
Proc. Natl. Acad. Sci. US, 44, 15, 1958.

106. TALALAY P. and LEVY H.R. : The steric and molecular specificity of steroid dehydrogenases.
in "Steric course of microbiological reactions".
Ciba Foundation Study Group, n° 2, p. 53, 1959.

107. TALALAY P. and WILLIAMS-ASHMAN H.G. : Participation of steroid hormones in the enzymatic transfer of hydrogen.
Rec. Progr. Hormone Res., 16, 1, 1960 (G. Pincus, ed).

108. TALALAY P. : Hydroxysteroid dehydrogenases of Pseudomonas Testosteroni.
in "Methods in Enzymology", 5, 512, 1962.

109. TALALAY P. : Hydroxysteroid dehydrogenases.
in "The Enzymes", 7, 177, 1963.

110. TALALAY P. : Biochemical approaches to the mechanism of action of steroid hormones.
in "The biochemical aspects of hormone action", p. 167, 1[illegible]
Little, Brown and Co.

111. TALALAY P. : Enzymatic mechanisms in steroid chemistry.
An. Rev. Biochem., 34, 347, 1965.

112. TELLER J.D. and BONGIOVANNI A.M. : Alteration of steroid dehydrogenase synthesis in a mutant of Pseudomonas Testosteroni.
Nature, 197, 1112, 1963.

113. VELLE W. : Studies on oestrogens in cattle. The metabolic transformation of oestradiol 17β to oestrone and oestradiol 17α in the young calf.
Acta Endocrinol., 28, 186, 1958.

114. VELLE W. and ERICHSON S. : Studies on oestrogens in cattle. Conversions of oestrogens by bovine kidney cells in vitro.

115. VILLEE C.A. and GORDON E.E. : Further studies on the action of oestradiol in vitro.
J. Biol. Chem., 216, 203, 1955.

116. VILLEE C.A. and HAGERMAN D.D. : On the identity of the estrogen sensitive enzyme of human placenta.
J. Biol. Chem., 233, 42, 1958.

117. VILLEE C.A., HAGERMAN D.D. and JOEL P.B. : An enzymatic basis for the physiologic functions of estrogens.
Rec. Progr. Hormone Res., 16, 49, 1960.

118. VILLEE C.A. and SPENCER J.M. : Some properties of the pyridine nucleotide-specific 17β-hydroxysteroid dehydrogenases of guinea pig liver.
J. Biol. Chem., 235, 3615, 1961.

119. VILLEE C.A. : The role of steroid hormones in the control of metabolic activity.
in "The molecular Control of Cellular Activity", p. 297, 1962 J.M. Allen, ed., New-York, Mac Graw Hill.

120. WARREN J.C. and CRIST R.D. : Site specificity and transhydrogenation by human placental estradiol-17β dehydrogenase.
The Endocrine Society, 48th Meeting, June 1966.

121. WERTHESSEN N.T., SCHWENK E., BAKER C.F. and FIELD N.S. : Estrone conversion capacity of blood of postmenopausal women with carcinoma of the breast.
Cancer Res., 10, 679, 1950.

122. WERTHESSEN N.T., BAKER C.F. and FIELD N.S. : Conversion of estrone on incubation in blood.
J. Biol. Chem., 184, 145, 1950.

123. WIELAND R.G., LEVY R.D., KATZ D. and HIRSCHMANN H.C. : Evidence for secretion of 3β-hydroxy-androst-5-en-17-one sulfate by measurement in normal human adrenal various blood.
Biochim. Biophys. Acta, 78, 566, 1963.

124. WILLIAMS-ASHMAN H.G., CASSMAN M. and KLAVIN S.M. : Two enzymic mechanisms for hydrogen transport by phenolic oestrogens.
Nature, 184, 427, 1959.

125. WILLIAMS-ASHMAN H.G., SHUTSUNG LIAO and TALALAY P. : Enzymatic transport of hydrogen by estrogenic hormones.
in "Biological activities of steroids in relation to Cancer" p. 147, 1960, Academic Press.

126. WILLIAMS-ASHMAN H.G. : Control mechanisms in cellular processes.
167-84, 1961, Ronald Press.

127. WILLIAMS-ASHMAN H.G. and SHUTSUNG LIAO : Sex hormones and hydrogen transport by isolated enzyme systems.
in "Action of hormones on molecular processes" p. 482, 1964
J. Wiley and Sons.

128. WOTIZ H.H., LEMON H.M. and VOVLGAROPOULOS A. : Studies in steroid metabolism. A - Metabolism of testosterone by human tissue slices.
J. Biol. Chem., 209, 437, 1954.

Vu le Président de Thèse

Professeur P. DESGREZ

Vu le Doyen de la Faculté

de Médecine de Paris

Vu le Permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris

Jean ROCHE